

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-262690

(43) 公開日 平成10年(1998)10月6日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C 1 2 P 13/00		C 1 2 P 13/00
B 0 1 F 17/50		B 0 1 F 17/50
	17/52	17/52
C 0 8 G 61/00		C 0 8 G 61/00
	65/44	65/44

審査請求 未請求 請求項の数27 O L (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-5865

(22) 出願日 平成10年(1998)1月14日

(31) 優先権主張番号 特願平9-9728

(32) 優先日 平9(1997)1月22日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002004

昭和電工株式会社

東京都港区芝大門1丁目13番9号

(72) 発明者 愛知後 貴

千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号

昭和電工株式会社総合研究所内

(72) 発明者 米田 正

千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号

昭和電工株式会社総合研究所内

(72) 発明者 青木 裕史

千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号

昭和電工株式会社総合研究所内

(74) 代理人 井理士 矢口 平

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フェノール性化合物等の高分子化方法及びその用途

(57) 【要約】

【課題】 アルカリ側に至適反応pHを有する新規なポリフェノールオキシダーゼの用途の開発、提供。

【解決手段】 スティルベラ、サゲノメラ、スタキリジウム属菌類が生産するポリフェノールオキシダーゼを用いフェノール化合物等から高分子化物を製造する方法。前記方法で得られる高分子化合物の、増粘剤、安定剤、凝集剤、乳化剤、分散剤、保水剤、酸化防止剤、接着剤、コンクリート混和剤、染色剤、塗料、石油回収剤、土壌改質剤、種子吹付表土安定剤、目止め剤、脱臭剤、消臭剤、農薬展着剤、殺菌剤、抗菌剤、ウィルス感染阻止剤、生物付着防止剤、生物忌避剤、殺虫剤、バップ剤、インキ基剤または木材処理剤への応用、さらには該酵素を用いる木材処理、コンクリート処理、土壌処理等の方法の提供。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の特性：

(1) 作用：ポリフェノールを酸化する；

(2) 至適反応 pH：pH 8. 2～8. 5 付近に至適反応 pH を有する；

(3) 至適反応温度：5 0℃付近に至適反応温度を有する；

(4) 分子量：ゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) 分析により測定した分子量が約 3 3, 0 0 0～7 6, 0 0 0 の範囲内にある；

(5) 等電点：等電点電気泳動により測定した等電点が約 5. 9～7. 0 の範囲内にある；を有するポリフェノールオキシダーゼを作用させることを特徴とする、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物の高分子化方法。

【請求項 2】 pH 8 以上のアルカリ域においてポリフェノールオキシダーゼを作用させることを特徴とする請求項 1 に記載の高分子化方法。

【請求項 3】 ペルオキシダーゼ作用を有する物質と共にポリフェノールオキシダーゼを用いることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の高分子化方法。

【請求項 4】 オキシダーゼ及びその基質と共にポリフェノールオキシダーゼを用いることを特徴とする請求項 1～3 のいずれかに記載の高分子化方法。

【請求項 5】 酸化剤として空気、酸素、オゾン、過酸化水素、過酸化水素前駆体、過酸前駆体または過酸を、単独で、または複数組み合わせ用いることを特徴とする請求項 1～4 のいずれかに記載の高分子化方法。

【請求項 6】 以下の特性：

(1) 作用：ポリフェノールを酸化する；

(2) 至適反応 pH：pH 8. 2～8. 5 付近に至適反応 pH を有する；

(3) 至適反応温度：5 0℃付近に至適反応温度を有する；

(4) 分子量：GFC 分析により測定した分子量が約 3 3, 0 0 0～7 6, 0 0 0 の範囲内にある；

(5) 等電点：等電点電気泳動により測定した等電点が約 5. 9～7. 0 の範囲内にある；を有するポリフェノールオキシダーゼを、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物に作用させ、高分子化することを特徴とする分子量の増大した化合物の製造方法。

【請求項 7】 以下の特性：

(1) 作用：ポリフェノールを酸化する；

(2) 至適反応 pH：pH 8. 2～8. 5 付近に至適反応 pH を有する；

(3) 至適反応温度：5 0℃付近に至適反応温度を有する；

(4) 分子量：GFC 分析により測定した分子量が約 3 3, 0 0 0～7 6, 0 0 0 の範囲内にある；

(5) 等電点：等電点電気泳動により測定した等電点が約 5. 9～7. 0 の範囲内にある；を有するポリフェノールオキシダーゼを、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物と、不飽和脂肪酸、不飽和アルコール、不飽和アルキル化合物、もしくは乾性油との混合物に作用させ、高分子化反応を行うことを特徴とする分子量の増大した化合物の製造方法。

【請求項 8】 以下の特性：

(1) 作用：ポリフェノールを酸化する；

(2) 至適反応 pH：pH 8. 2～8. 5 付近に至適反応 pH を有する；

(3) 至適反応温度：5 0℃付近に至適反応温度を有する；

(4) 分子量：GFC 分析により測定した分子量が約 3 3, 0 0 0～7 6, 0 0 0 の範囲内にある；

(5) 等電点：等電点電気泳動により測定した等電点が約 5. 9～7. 0 の範囲内にある；を有するポリフェノールオキシダーゼを、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物と、芳香剤、消臭剤、防錆剤、難燃化剤、抗菌剤、防腐剤、殺菌剤、防虫剤、抗ウイルス剤、及び生物忌避剤から選ばれる少なくとも 1 種の薬剤との混合物に作用させ、高分子化反応を行うことを特徴とする分子量の増大した化合物の製造方法。

【請求項 9】 薬剤が、金属塩、金属化合物、あるいは金属錯体の溶液もしくは微粉体である請求項 8 記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【請求項 1 0】 金属が、銅、砒素、亜鉛、クロム、ニッケル、アルミニウム、モリブデン、マグネシウムあるいは銀から選ばれる少なくとも 1 種である請求項 9 記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【請求項 1 1】 薬剤が、ホウ素塩、ホウ素系化合物、あるいはホウ素含有錯体の溶液もしくは微粉体である請求項 8 記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【請求項 1 2】 薬剤が、植物由来の抽出物、抽出成分、あるいは植物抽出成分と同等の構造を有する合成物である請求項 8 記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【請求項 1 3】 薬剤が、水酸基、アミノ基、ハロゲン、ニトロ基から選ばれる置換基を 1 つあるいは複数有する芳香族化合物あるいは環状化合物である請求項 8 記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【請求項 1 4】 フェノール性化合物及び／または芳香族アミン化合物が、リグニンもしくはリグニン誘導体である請求項 6～1 3 のいずれかに記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【請求項 1 5】 リグニン誘導体がリグニンスルホン酸もしくはリグニンスルホン酸塩である請求項 1 4 記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【請求項 1 6】 pH 8 以上のアルカリ域においてポリフェノールオキシダーゼを作用させることを特徴とする請求項 6 ～ 1 5 のいずれかに記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【請求項 1 7】 ペルオキシダーゼ作用を有する物質と共にポリフェノールオキシダーゼを用いることを特徴とする請求項 6 ～ 1 6 のいずれかに記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【請求項 1 8】 オキシダーゼ及びその基質と共にポリフェノールオキシダーゼを用いることを特徴とする請求項 6 ～ 1 7 のいずれかに記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【請求項 1 9】 酸化剤として空気、酸素、オゾン、過酸化水素、過酸化水素前駆体、過酸前駆体または過酸を、単独で、または複数組み合わせ用いることを特徴とする請求項 6 ～ 1 8 のいずれかに記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【請求項 2 0】 請求項 6 ～ 1 9 のいずれかに記載の分子量の増大した化合物の製造方法を用いることを特徴とする、増粘剤、安定剤、凝集剤、乳化剤、分散剤、保水剤、調湿剤、酸化防止剤、接着剤、染色剤、塗料、防錆剤、難燃化剤、石油回収剤、土壌改質剤、種子吹付表土安定剤、脱臭剤、消臭剤、農薬展着剤、脱酸素剤、防腐剤、殺菌剤、抗菌剤、ウィルス感染阻止剤、生物付着防止剤、生物忌避剤、殺虫剤、防虫剤、パップ剤、インキ基剤、コンクリート混和剤または木材処理剤の製造方法。

【請求項 2 1】 請求項 6 ～ 1 9 のいずれかに記載の製造方法を実施するための反応を、土壌中で行うことを特徴とする土壌処理方法。

【請求項 2 2】 請求項 6 ～ 1 9 のいずれかに記載の製造方法を実施するための反応を、多孔質物品中で行うことを特徴とする多孔質物品の処理方法。

【請求項 2 3】 反応液を加圧及び／または減圧により多孔質物品中に含浸して実施することを特徴とする請求項 2 2 記載の多孔質物品の処理方法。

【請求項 2 4】 加圧を 1 ～ 2 0 気圧で実施することを特徴とする請求項 2 3 に記載の多孔質物品の処理方法。

【請求項 2 5】 多孔質物品が金属焼結体、鋳造品、合金、ダイカスト品、セラミックス、レンガ、コンクリート、木材、木質加工材、モミ、藁、竹材、もしくは合成樹脂の発泡体である請求項 2 2 ～ 2 4 のいずれかに記載の多孔質物品の処理方法。

【請求項 2 6】 請求項 2 2 ～ 2 5 のいずれかに記載の処理方法を用いることを特徴とする、強度、耐磨耗性、耐候性、防錆性、難燃性、抗菌性、防腐性、殺菌性、防虫性、殺虫性、抗ウィルス性、生物忌避性、接着性、薬

剤徐放性、着色、寸法安定性、割れ防止性、消臭性、脱酸素性、調湿性、吸水性、撥水性、表面平滑性、生物親和性、イオン交換性、ホルムアルデヒド吸収性、薬剤溶脱防止性、あるいは無機化合物の多孔質物品表面への移行防止性が付与され、あるいは向上した多孔質物品の製造方法。

【請求項 2 7】 請求項 6 ～ 1 9 のいずれかに記載の方法で製造した分子量の増大した化合物を含む増粘剤、安定剤、凝集剤、乳化剤、分散剤、保水剤、調湿剤、酸化防止剤、接着剤、染色剤、塗料、防錆剤、難燃化剤、石油回収剤、土壌改質剤、種子吹付表土安定剤、脱臭剤、消臭剤、農薬展着剤、脱酸素剤、防腐剤、殺菌剤、抗菌剤、ウィルス感染阻止剤、生物付着防止剤、生物忌避剤、殺虫剤、防虫剤、パップ剤、インキ基剤、コンクリート混和剤または木材処理剤。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】本発明は、アルカリ側に至適反応 pH を有する新規なポリフェノールオキシダーゼの利用方法に関する。さらに詳しく言えば、本発明は pH 8 近辺のアルカリ側に至適反応 pH を有する新規なポリフェノールオキシダーゼをフェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物に作用させることによるこれらの化合物の高分子化処理方法や、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物の速やかな分子量の増大反応を利用して得られる、増粘剤、安定剤、凝集剤、乳化剤、分散剤、保水剤、調湿剤、酸化防止剤、接着剤、染色剤、塗料、防錆剤、難燃化剤、石油回収剤、土壌改質剤、種子吹付表土安定剤、脱臭剤、消臭剤、農薬展着剤、脱酸素剤、防腐剤、殺菌剤、抗菌剤、ウィルス感染阻止剤、生物付着防止剤、生物忌避剤、殺虫剤、防虫剤、パップ剤、インキ基剤、コンクリート混和剤または木材処理剤、これら各種剤類の製造方法、土壌処理方法、さらには金属焼結体、鋳造品、合金、ダイカスト品、セラミックス、レンガ、コンクリート、木材、木質加工材、モミ、藁、竹材、もしくは合成樹脂の発泡体などの多孔質物品の処理方法に関するものである。

【0 0 0 2】

【従来の技術】従来、担子菌類、不完全菌類等の糸状菌が生産するポリフェノールオキシダーゼやラッカーゼによるポリフェノール酸化作用が知られている。しかしながら、従来のポリフェノール酸化酵素はアルカリ側で活性が著しく低いため、実際の用途が限られていた。ポリフェノールを構造部分に有する天然物として、フラボノイド系、キサントン系、メラニン系などの植物色素やリグニンが知られており、ポリフェノールオキシダーゼはこれらの天然物に対する酸化作用を有する。また、毒性

が問題になっているジクロロフェノール、トリクロロフェノールをもポリフェノールオキシダーゼは反応基質にできる。それ故に、これらの天然物や非天然物を含有する廃水処理においてもポリフェノールオキシダーゼは有用である。しかしながら従来の酵素では酸性 pH から中性 pH に至適反応 pH を有するためアルカリ pH での利用は実質的に困難であり、このことがポリフェノールオキシダーゼの産業上の利用範囲を狭くする要因となっていた。

【0003】また、従来、フェノール性化合物等が、酵素、例えば担子菌類や不完全菌類の生産するラッカーゼやポリフェノールオキシダーゼを利用して高分子化できることが知られている (Journal of Biotechnology, 13, 229-241, 1990 など)。しかしながら、菌類の生産するラッカーゼやポリフェノールオキシダーゼはその至適反応 pH が酸性領域にあるため、これらの酵素を用いて高分子化反応を触媒・加速するためには、反応を酸性から中性の pH 域で実施する必要がある、しかもその高分子化反応の速度は十分に高いものではなかった。また、これらの酵素が反応できる天然の有機化合物の多くはポリフェノール化合物であり、これらポリフェノール化合物の溶解度は酸性から中性の pH 域において低下するにもかかわらず、酵素の至適反応 pH が酸性領域にあるため、反応を酸性から中性の pH 域で実施する必要がある、高濃度のポリフェノール化合物を効率よく高分子化することができないという欠点があった。また、多くのポリフェノール化合物はアルカリ pH 域でその自動酸化が加速されるにもかかわらず、従来は、酸性から中性の pH 域において酵素的な酸化重合を行っていたため、自動酸化を高分子化反応において有効に利用できないという欠点があった。

【0004】また、従来、ポリフェノール酸化酵素を重合触媒とする様々な酵素重合法が、W O 8 7 - 2 9 3 9 号、特開平 5 - 1 1 7 5 9 1 号、特開平 6 - 2 8 7 5 1 6 号、特開平 7 - 1 2 6 3 5 4 号、特開平 7 - 1 2 6 3 7 号等で実施されていた。しかしながら、これらの酵素重合法は、溶液中あるいは固体表面での重合反応とその利用に関するものである。また、ウルシオール等のポリフェノール物質を、ラッカーゼを重合触媒として重合する反応を、塗装剤、接着剤に利用する方法は、古来より漆として用いられている。また、ラッカーゼ等のポリフェノール酸化作用を有する酵素をその基質と共に段ボールに塗布し、段ボールの耐水性を向上させる試みが行われている。しかしながら、これらの漆利用方法やこれに類似する技術では、本質的に固体表面あるいは固体張り合わせ面での重合反応であり、また、高分子化反応の反応液に対する添加物も着色を目的とする顔料や、天然漆を真似た水溶性多糖類などに留まっており、漆類似反応の工業的な利用・応用は限られたものであった。

【0005】また、微生物による腐食を阻止するため

に、誘導体化したリグニンを木材に加える第 1 段階と、リグニンを水不溶性にするために金属イオンを含有する弱酸性水溶液を含浸する第 2 段階からなる木材含浸方法が、特開昭 6 1 - 2 6 8 7 2 9 号で試みられている。しかしながらこの方法は、リグニン誘導体と金属イオンとの複合物の水に対する溶解度は低下するが、リグニン誘導体自体は水不溶性物質として固定されてはいない。また、処理のためには 2 種類の処理剤を切り替えて用いなければならない、現在木材保存剤として主に用いられ、1 剤で処理が可能な C C A 系水溶液 (クロム・銅・砒素化合物) を注入するための設備へ導入するのは困難である。従って、木材への固着力の強いリグニン誘導体利用方法、及び 1 剤で処理が可能な方法の開発が望まれていた。

【0006】また、従来、様々な薬剤を多孔質物品中に含浸し、強度、耐摩耗性、耐候性、防錆性、難燃性、抗菌性、防汚性、殺菌性、防虫性、殺虫性、抗ウィルス性、生物忌避性、接着性、薬剤徐放性、着色、寸法安定性、割れ防止性、調湿性、吸水性、撥水性、表面平滑性、生物親和性、イオン交換性、ホルムアルデヒド吸収性、薬剤溶脱防止性、あるいは無機化合物の多孔質物品表面への移行防止性の付与や向上が図られていたが、注入された薬剤が溶脱するため長期間有効な上記の性質を多孔質物品に付与することが困難であったり、溶脱した薬剤による環境や人体への影響が懸念されており、強い溶脱抑止効果、添加した薬剤の長期間の効力が得られ且つ処理操作が容易な、多孔質物品の処理方法が求められていた。

【0007】また、従来より物性の改質、強度の付与、集合材の製造、抗菌性や防虫性の付与等を目的として、レンガ等の焼結体、木材、木片、木粉、繊維、紙、もしくはパルプ等の多孔質物品に対して熱硬化性樹脂等を含浸あるいは塗布するという処理方法が実施されている。しかしながら、熱硬化性樹脂中には未反応のホルムアルデヒドが含まれるため人体への影響が懸念されており、ホルムアルデヒドを含有しない化合物の利用が求められていた。また、熱硬化性樹脂の硬化のためには、80～200℃での加熱が必要であるため、特別の加熱施設と加熱用のエネルギーを必要とする欠点があった。

【0008】一方、動植物由来のポリフェノールオキシダーゼの中には、pH 8 以上の高 pH 域に至適 pH を有するものが知られている (Comp. Biochem. Physiol., 1992, 102B(4) 891-896 : Zhongguo Nongye Huaxue Huizhi, 1991, 29(2), 177-185 : Agric. Biol. Chem., 1991, 55(1), 13-17)。しかしながら、これらのポリフェノールオキシダーゼを動植物の組織から安定かつ安価に生産することは困難であり、産業上の利用に供するためには微生物由来のポリフェノールオキシダーゼが望まれていた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題は、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物を高分子化する新規な酵素触媒による方法を提供することにある。本発明が解決しようとする別の課題は、アルカリ側に至適反応 pH を有するポリフェノールオキシダーゼを用いることにより、アルカリ pH 域での実用的な酵素的酸化を達成して、ポリフェノールオキシダーゼの利用分野の拡大に寄与することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らはポリフェノール物質の酸化をアルカリ pH において触媒する菌体外生産物を広範な微生物において鋭意探索を行い、不完全菌類であるスティルベラ (*Stilbella*) 属、サゲノメラ (*Sagenomella*) 属、あるいはスタキリジウム (*Stachyridium*) 属に属する菌株が pH 8 近辺のアルカリ側に至適反応 pH を有する目的の酵素を菌体外に生産することを見出し、本発明を完成させるに至った。また、本発明者らはこれらの酵素をアルカリ域、特に pH 8 以上のアルカリ pH 域で用いることにより、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物の高分子化を効率よく達成できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0011】さらに、本発明者らは、長期間有効な、強度、耐磨耗性、耐候性、防錆性、難燃性、抗菌性、防腐性、殺菌性、防虫性、殺虫性、抗ウィルス性、生物忌避性、接着性、薬剤徐放性、着色、寸法安定性、割れ防止性、消臭性、脱酸素性、調湿性、吸水性、撥水性、表面平滑性、生物親和性、イオン交換性、ホルムアルデヒド吸収性、薬剤溶脱防止性、あるいは無機化合物の多孔質物品表面への移行防止性を、木材等の多孔質物品において付与あるいは向上させるための方法を開発するため、鋭意研究を行った。そして、本発明のポリフェノールオキシダーゼ、及び、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物、さらには不飽和化合物及び／または薬剤を多孔質物品に含浸あるいは加圧及び／または減圧により含浸し、多孔質物品中で高分子化反応を行うことにより本発明の目的が達成されることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0012】すなわち本発明は、酸素（空気）を酸化剤として利用するポリフェノールオキシダーゼを使用するものであり、こうした酵素あるいは酵素系が、多孔質物品内部の酸素供給速度の低い環境において、酸化反応、高分子化反応を触媒するということは驚くべきことである。特に、減圧操作を処理工程の一部として含む含浸処理は、含浸の困難な多孔質物品に対する処理液の注入量を高めるための操作として極めて有効である。しかしな

がら、減圧操作を経た処理液及び処理物は、液中の溶存酸素濃度が低下しており、酸素を酸化剤として利用する触媒反応のためには不利な状態にある。しかるに、驚くべきことに、減圧操作を経た多孔質物品の処理物においても、その内部での触媒的な酸化反応、高分子化反応が進行することを見出した。

【0013】また、含浸の困難な多孔質物品に対する処理液の注入量を高めるための操作として、加圧注入法も極めて有効であるが、加圧処理に対して多くの酵素は不安定であることが知られている。しかしながら、驚くべきことに、本発明のポリフェノールオキシダーゼが、加圧注入処理を経てもその触媒活性を維持し、さらに多孔質物品内部の酸素供給速度の低い環境において、酸化反応、高分子化反応を触媒するということを見出した。また、多孔質物品の処理効果を増大する目的や、多孔質物品内部で重合したフェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物による薬剤固定能や薬剤徐放能を有効に活用する目的で、様々な芳香剤、消臭剤、防錆剤、難燃化剤、抗菌剤、防腐剤、殺菌剤、防虫剤、抗ウィルス剤、あるいは生物忌避剤を併用する処理方法について、鋭意研究を行った。そして、本発明のポリフェノールオキシダーゼを用いる高分子化反応により、一般に、酵素反応阻害あるいは酵素の失活をもたらすと考えられている薬剤を含む多くの薬剤において、その固定あるいは徐放が可能であることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0014】すなわち本発明は以下のものを提供するものである。

[1] 以下の特性：

- (1) 作用：ポリフェノールを酸化する；
- (2) 至適反応 pH：pH 8. 2～8. 5 付近に至適反応 pH を有する；
- (3) 至適反応温度：5 0℃付近に至適反応温度を有する；
- (4) 分子量：ゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) 分析により測定した分子量が約 3 3, 0 0 0～7 6, 0 0 0 の範囲内にある；
- (5) 等電点：等電点電気泳動により測定した等電点が約 5. 9～7. 0 の範囲内にある；を有するポリフェノールオキシダーゼを作用させることを特徴とする、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物の高分子化方法。

【0015】[2] pH 8 以上のアルカリ域においてポリフェノールオキシダーゼを作用させることを特徴とする前記 [1] に記載の高分子化方法。

[3] ペルオキシダーゼ作用を有する物質と共にポリフェノールオキシダーゼを用いることを特徴とする前記

[1] または [2] に記載の高分子化方法。

〔４〕オキシダーゼ及びその基質と共にポリフェノールオキシダーゼを用いることを特徴とする前記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の高分子化方法。

〔５〕酸化剤として空気、酸素、オゾン、過酸化水素、過酸化水素前駆体、過酸前駆体または過酸を、単独で、または複数組み合わせ用いることを特徴とする前記〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の高分子化方法。

【００１６】〔６〕以下の特性：

- (１) 作用：ポリフェノールを酸化する；
- (２) 至適反応 pH：pH 8. 2～8. 5 付近に至適反応 pH を有する；
- (３) 至適反応温度：5 0℃付近に至適反応温度を有する；
- (４) 分子量：G F C 分析により測定した分子量が約 3 3, 0 0 0～7 6, 0 0 0 の範囲内にある；
- (５) 等電点：等電点電気泳動により測定した等電点が約 5. 9～7. 0 の範囲内にある；を有するポリフェノールオキシダーゼを、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物に作用させ、高分子化することを特徴とする分子量の増大した化合物の製造方法。

【００１７】〔７〕以下の特性：

- (１) 作用：ポリフェノールを酸化する；
- (２) 至適反応 pH：pH 8. 2～8. 5 付近に至適反応 pH を有する；
- (３) 至適反応温度：5 0℃付近に至適反応温度を有する；
- (４) 分子量：G F C 分析により測定した分子量が約 3 3, 0 0 0～7 6, 0 0 0 の範囲内にある；
- (５) 等電点：等電点電気泳動により測定した等電点が約 5. 9～7. 0 の範囲内にある；を有するポリフェノールオキシダーゼを、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物と、不飽和脂肪酸、不飽和アルコール、不飽和アルキル化合物、もしくは乾性油との混合物に作用させ、高分子化反応を行うことを特徴とする分子量の増大した化合物の製造方法。

【００１８】〔８〕以下の特性：

- (１) 作用：ポリフェノールを酸化する；
- (２) 至適反応 pH：pH 8. 2～8. 5 付近に至適反応 pH を有する；
- (３) 至適反応温度：5 0℃付近に至適反応温度を有する；
- (４) 分子量：G F C 分析により測定した分子量が約 3 3, 0 0 0～7 6, 0 0 0 の範囲内にある；
- (５) 等電点：等電点電気泳動により測定した等電点が約 5. 9～7. 0 の範囲内にある；を有するポリフェノールオキシダーゼを、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キ

ノン化合物、または芳香族アミン化合物と、芳香剤、消臭剤、防錆剤、難燃化剤、抗菌剤、防腐剤、殺菌剤、防虫剤、抗ウイルス剤、及び生物忌避剤から選ばれる少なくとも 1 種の薬剤との混合物に作用させ、高分子化反応を行うことを特徴とする分子量の増大した化合物の製造方法。

【００１９】〔９〕薬剤が、金属塩、金属化合物、あるいは金属錯体の溶液もしくは微粉体である前記〔８〕記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【１０】金属が、銅、砒素、亜鉛、クロム、ニッケル、アルミニウム、モリブデン、マグネシウムあるいは銀から選ばれる少なくとも 1 種である前記〔９〕記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【１１】薬剤が、ホウ素塩、ホウ素系化合物、あるいはホウ素含有錯体の溶液もしくは微粉体である前記〔８〕記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【１２】薬剤が、植物由来の抽出物、抽出成分、あるいは植物抽出成分と同等の構造を有する合成物である前記〔８〕記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【１３】薬剤が、水酸基、アミノ基、ハロゲン、ニトロ基から選ばれる置換基を 1 つあるいは複数有する芳香族化合物あるいは環状化合物である前記〔８〕記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【００２０】〔１４〕フェノール性化合物及び／または芳香族アミン化合物が、リグニンもしくはリグニン誘導体である前記〔６〕～〔１３〕のいずれかに記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【１５】リグニン誘導体がリグニンスルホン酸もしくはリグニンスルホン酸塩である前記〔１４〕記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【１６】pH 8 以上のアルカリ域においてポリフェノールオキシダーゼを作用させることを特徴とする前記〔６〕～〔１５〕のいずれかに記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【１７】パルオキシダーゼ作用を有する物質と共にポリフェノールオキシダーゼを用いることを特徴とする前記〔６〕～〔１６〕のいずれかに記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【１８】オキシダーゼ及びその基質と共にポリフェノールオキシダーゼを用いることを特徴とする前記〔６〕～〔１７〕のいずれかに記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【１９】酸化剤として空気、酸素、オゾン、過酸化水素、過酸化水素前駆体、過酸前駆体または過酸を、単独で、または複数組み合わせ用いることを特徴とする前記〔６〕～〔１８〕のいずれかに記載の分子量の増大した化合物の製造方法。

【００２１】〔２０〕前記〔６〕～〔１９〕のいずれかに記載の分子量の増大した化合物の製造方法を用いることを特徴とする、増粘剤、安定剤、凝集剤、乳化剤、分

散剤、保水剤、調湿剤、酸化防止剤、接着剤、染色剤、塗料、防錆剤、難燃化剤、石油回収剤、土壌改質剤、種子吹付表土安定剤、脱臭剤、消臭剤、農薬展着剤、脱酸素剤、防腐剤、殺菌剤、抗菌剤、ウィルス感染阻止剤、生物付着防止剤、生物忌避剤、殺虫剤、防虫剤、バップ剤、インキ基剤、コンクリート混和剤または木材処理剤の製造方法。

【21】前記【6】～【19】のいずれかに記載の製造方法を実施するための反応を、土壌中で行うことを特徴とする土壌処理方法。

【0022】【22】前記【6】～【19】のいずれかに記載の製造方法を実施するための反応を、多孔質物品中で行うことを特徴とする多孔質物品の処理方法。

【23】反応液を加圧及び／または減圧により多孔質物品中に含浸して実施することを特徴とする前記【22】記載の多孔質物品の処理方法。

【24】加圧を1～20気圧で実施することを特徴とする前記【23】に記載の多孔質物品の処理方法。

【25】多孔質物品が金属焼結体、铸造品、合金、ダイカスト品、セラミックス、レンガ、コンクリート、木材、木質加工材、モミ、藁草、藁、竹材、もしくは合成樹脂の発泡体である前記【22】～【24】のいずれかに記載の多孔質物品の処理方法。

【0023】【26】前記【22】～【25】のいずれかに記載の処理方法を用いることを特徴とする、強度、耐摩耗性、耐候性、防錆性、難燃性、抗菌性、防腐性、殺菌性、防虫性、殺虫性、抗ウィルス性、生物忌避性、接着性、薬剤徐放性、着色、寸法安定性、割れ防止性、消臭性、脱酸素性、調湿性、吸水性、撥水性、表面平滑性、生物親和性、イオン交換性、ホルムアルデヒド吸収性、薬剤溶脱防止性、あるいは無機化合物の多孔質物品表面への移行防止性が付与され、あるいは向上した多孔質物品の製造方法。

【27】前記【6】～【19】のいずれかに記載の方法で製造した分子量の増大した化合物を含む増粘剤、安定剤、凝集剤、乳化剤、分散剤、保水剤、調湿剤、酸化防止剤、接着剤、染色剤、塗料、防錆剤、難燃化剤、石油回収剤、土壌改質剤、種子吹付表土安定剤、脱臭剤、消臭剤、農薬展着剤、脱酸素剤、防腐剤、殺菌剤、抗菌剤、ウィルス感染阻止剤、生物付着防止剤、生物忌避剤、殺虫剤、防虫剤、バップ剤、インキ基剤、コンクリート混和剤または木材処理剤。

【0024】

【発明の実施の形態】以下に本発明を詳細に説明する。

【生産菌】本発明に使用するポリフェノールオキシダーゼを得るために用いるスティルベラ (*Stilbella*) 属に属する菌株にはスティルベラ・アニュラタ (*Stilbella annulata*)、スティルベラ・ブルビコーラ (*Stilbella bulbicola*)、スティルベラ・エリスロセファラ (*Stilbella erythrocephala*)、スティルベラ・フラベセンス

(*Stilbella flavescens*)、スティルベラ・フラビペス (*Stilbella flavipes*)、スティルベラ・サーモフィラ (*Stilbella thermophila*)、スティルベラ・s p.

(*Stilbella* sp.) が挙げられるが、好ましくはスティルベラ・s p. SD3101 (*Stilbella* sp. SD3101)

(工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-15963として寄託され、国際寄託に移管されてFERM BP-6219の受託番号が付与されている)を用いる。

【0025】また、本発明に使用するポリフェノールオキシダーゼを得るために用いるサゲノメラ (*Sagenomella*) 属に属する菌株にはサゲノメラ・ビリデ (*Sagenomella laviride*)、サゲノメラ・s p. (*Sagenomella* sp.)

が挙げられるが、好ましくはサゲノメラ・s p. S

D3102 (*Sagenomella* sp. SD3102) (工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-15964として寄託され、

国際寄託に移管されてFERM BP-6220の受託番号が付与されている)を用いる。また、本発明に使用するポリフェノールオキシダーゼを得るために用いるスタキリジウム

(*Stachylidium*) 属に属する菌株にはスタキリジウム・ビカラ (*Stachylidium bicolor*)、スタキリジウム・セ

オブロメ (*Stachylidium theobromae*)、スタキリジウム・s p. (*Stachylidium* sp.) が挙げられるが、好ま

しくはスタキリジウム・s p. SD3103 (*Stachylidium* sp. SD3103) (工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-15965として寄託され、

国際寄託に移管されてFERM BP-6221の受託番号が付与されている)を用いる。

【0026】本発明に使用するポリフェノールオキシダーゼを生産する代表的な菌株について、ポテトキャロット寒天培地及びマルトエキス寒天培地上で、25℃で14～

60日間培養したときの集落の色調、形状及び分生子、分生子形成構造等の形態観察を行った。その結果、アクレモニウム属 (*Acremonium*) に類似した白色、粘質状の集

落を形成し、分生子柄束 (シンネマ) を形成し、長径 3～5μmの楕円形の小型分生子を形成する糸状菌をステ

イルベラ・s p. SD3101 (*Stilbella* sp. SD3101) と命名し、また、同様に、アクレモニウム属 (*Acremonium*) に類似した白色、粘質状の集落を形成し、分

生子柄束 (シンネマ) を形成せず連鎖状の分生子を形成し、長径 2～4μmの楕円形～レモン形の小型分生子を

形成する糸状菌をサゲノメラ・s p. SD3102 (*Sagenomella* sp. SD3102)、さらには、暗褐色～黒色の粘質状集落を形成し、輪生した分生子柄とフィアロ型分

生子を有するが分生子座は形成しない糸状菌をスタキリジウム・s p. SD3103 (*Stachylidium* sp. SD3103) と命名した。

【0027】【酵素の調製】本発明に使用するポリフェノールオキシダーゼは、前記のスティルベラ属またはサゲノメラ属、スタキリジウム属に属する菌株及びその変

異株を培養して得られる他、遺伝子操作菌を利用して調

製する。

【0028】【調剤の調製】本発明に使用するポリフェノールオキシダーゼは、前記のスティルベラ属またはサゲノメラ属、スタキリジウム属に属する菌株及びその変

異株を培養して得られる他、遺伝子操作菌を利用して調

製する。

製することも可能である。すなわち、該ポリフェノールオキシダーゼをコードするDNAが宿主生物での酵素発現機能を有する適当なプロモーター、及びオペレーター、ターミネーターDNAと共に、宿主生物中でベクターを複製するための複製開始点を有するDNAベクターに挿入された発現ベクターを用いて形質転換された宿主細胞、または該ポリフェノールオキシダーゼをコードするDNAが宿主生物での酵素発現機能を有する適当なプロモーター、及びオペレーター、ターミネーターDNAと共に、宿主細胞DNAにインテグレーションせしめることで形質転換された宿主細胞を、ポリフェノールオキシダーゼの発現できる条件のもとに培養し、さらにポリフェノールオキシダーゼを培地から回収する方法によっても生産される。

【0028】また、本発明のポリフェノールオキシダーゼは、該ポリフェノールオキシダーゼをコードするDNA配列等を基に得られる該ポリフェノールオキシダーゼのアミノ酸配列に関する知見を基に、従来の酸性側に至適反応pHを有するポリフェノールオキシダーゼのDNAを改変するプロテイン・エンジニアリングの手法によって生産されるものであってもよい。本発明のポリフェノールオキシダーゼをコードするDNA断片の取得のためには、例えば本発明の菌株からのcDNAまたはゲノムライブラリを分離源とし、本発明のポリフェノールオキシダーゼのアミノ酸配列もしくは既知のポリフェノールオキシダーゼのアミノ酸配列に基づいて合成されたオリゴヌクレオチドをプローブとして目的のDNA断片を特定するか、または酵素活性を発現するクローンを選択するか、または該ポリフェノールオキシダーゼに対する抗体と反応する蛋白質を生産するクローンを選択するといった常法によって行うことができる。

【0029】本発明に使用するポリフェノールオキシダーゼを得るための培養は、通常用いられる合成培地や有機炭素源及び有機窒素源を含む栄養培地が使用可能である。また、Cu²⁺イオンを金属塩として0.001mMから10mM、好ましくは0.01mMから1mMの濃度で添加することが望ましい。培養温度は10～60℃、好ましくは20～40℃である。また、適当な培養時間は20時間から250時間、好ましくは50時間から150時間である。分泌されたポリフェノールオキシダーゼは培地中から周知の方法で回収できる。この回収手順には、遠心分離もしくはろ過、膜分離により培地から細胞を分離し、例えばイオン交換クロマトグラフィー等によるクロマトグラフィーを行うという一連の手順が含まれる。また、限外ろ過膜を用いる膜濃縮も有効である。

【0030】[酵素の性質] 本発明に使用するポリフェノールオキシダーゼは以下の特性を有する。

(1) 作用：ポリフェノールを酸化する；

(2) 至適反応pH：pH8.2～8.5付近に至適反

応pHを有する；

(3) 至適反応温度：50℃付近に至適反応温度を有する；

(4) 分子量：ゲルろ過クロマトグラフィー(GFC)分析により測定した分子量が約33,000～76,000の範囲内にある；

(5) 等電点：等電点電気泳動により測定した等電点が約5.9～7.0の範囲内にある。

【0031】本発明に使用する代表的なポリフェノールオキシダーゼとしては以下のものが挙げられる。

① スティルベラ・s.p. (*Stilbella sp.*) SD3101 (受託番号FERM P-15963) 由来のポリフェノールオキシダーゼ；

(1) 作用：ポリフェノールを酸化する；

(2) 至適反応pH：pH8.2付近に至適反応pHを有する；

(3) 至適反応温度：50℃付近に至適反応温度を有する；

(4) 分子量：GFC分析により測定した分子量が約76,000；

(5) 等電点：等電点電気泳動により測定した等電点が約6.6。

② サゲノメラ・s.p. (*Sagenomella sp.*) SD3102 (受託番号FERM P-15964) 由来のポリフェノールオキシダーゼ；

(1) 作用：ポリフェノールを酸化する；

(2) 至適反応pH：pH8.5付近に至適反応pHを有する；

(3) 至適反応温度：50℃付近に至適反応温度を有する；

(4) 分子量：GFC分析により測定した分子量が約33,000；

(5) 等電点：等電点電気泳動により測定した等電点が約5.9。

③ スタキリジウム・s.p. (*Stachyridium sp.*) SD3103 (受託番号FERM P-15965) 由来のポリフェノールオキシダーゼ；

(1) 作用：ポリフェノールを酸化する；

(2) 至適反応pH：pH8.2付近に至適反応pHを有する；

(3) 至適反応温度：50℃付近に至適反応温度を有する；

(4) 分子量：GFC分析により測定した分子量が約55,000；

(5) 等電点：等電点電気泳動により測定した等電点が約7.0。

【0032】これら3種類のポリフェノールオキシダーゼは5～11の広いpH範囲で酸化反応を行えるが、好ましくはpH6～10、より好ましくはpH7～9であり、pH8近辺に至適pHがあり、中性からアルカリ性

での酸化反応を触媒するという特長を有する(図1~図3)。また、pH8で10分間の反応を行った場合の至適温度は50℃付近にあり(図4~図6)、さらには、様々な温度で30分間の加熱処理を施した後の活性は、50℃以下の範囲でほぼ100%の残存活性を示した

(図7~図9)。さらには、様々なpHのバッファー中で30℃、30分間の処理を施した後の残存活性は、広範囲のpHにおける安定性を示した(図10)。これらの結果は、中性からアルカリ性の広範囲のpH域で、中低温の様々な溶液中での酸化反応を保証する。

【0033】また、本発明に係るポリフェノールオキシダーゼを、従来の酸性側に至適反応pHを有する酵素と共に組み合わせて用いることも可能である。つまり、従来知られている酸性側に至適反応pHを有するポリフェノールオキシダーゼと本発明に係るポリフェノールオキシダーゼを組み合わせて用いることで、酸性からアルカリ性の広範囲のpH域においてポリフェノールオキシダーゼ反応を行うことが可能となる。このような目的で酵素を混合して用いるとき、酸性側に至適反応pHを有するポリフェノールオキシダーゼの活性量と本発明に係るポリフェノールオキシダーゼの活性量の混合比率は、好ましくは1:10~10:1、より好ましくは1:3~3:1である。このようにして広範囲のpH域においてポリフェノールオキシダーゼ反応を達成するためにも、本発明に係るポリフェノールオキシダーゼは有用である。

【0034】【活性測定法】本発明において、ポリフェノール酸化活性の活性測定は25℃において20ppmのシリンガルダジン(syringaldazine)と100mMのリン酸カリウムバッファー溶液(pH8.2)を含む水溶液中で反応を行い、525nmの吸光度を測定することで行った。そして、1分間に1μmolのシリンガルダジンを酸化する活性量を1unit(以下Uと略す)と定義した。

【0035】【フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物】本発明で高分子化する対象であるフェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物は、本発明で使用する酵素が酸化できる物質であればいかなる化合物も使用可能である。このような化合物の具体的な例としては、リグニン、リグニンスルホン酸、フミン酸、ニトロフミン酸、タンニン、カテキン、没食子酸、ウルシオール、ヘスペリジン、クロロゲン酸、ヒノキチオール、ピロカテコール、ハイドロキノ、*o*-クマリン酸、*p*-クマリン酸、コニフェリルアルコール、コニフェリルアルデヒド、3,4-ジヒドロキシ安息香酸、*tert*-ブチルハイドロキノ、フェニルハイドロキノ、トリメチルハイドロキノ、3,4-ジヒドロキシケイ皮酸、エチル-3,4-

ジヒドロキシケイ皮酸、ピロガロール、4-ヒドロキシシナミルアルコール、ラウリルガレート、オクチルガレート、シリンギン酸、シナミルアルコール、シナピン酸、シナピンアルデヒド、ホモバニラ酸、ホモバニルアルコール、ホモバニロニトリル、フェルラ酸、バニリン、*o*-バニリン、バニラ酸、バニルアルコール、バニルアミン、バニルアジン、アスコルビン酸、1,2-ジヒドロキシナフタレン、2,3-ジヒドロキシナフタレン、6,7-ジヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸、アンスラロビン、アリザリン、キニザリン、*o*-フェニレンジアミン、*p*-フェニレンジアミン、3,4-ジアミノベンゾフェノン、*o*-アニシジン、*p*-アニシジン、*o*-アミノフェノール、*p*-アミノフェノール、1,2-ジアミノアンスラキノン、1,4-ジアミノアンスラキノンなどの化合物とこれらを誘導体化した化合物が挙げられる。

【0036】これらの化合物の他にも本発明で使用する酵素が酸化できる物質であれば、高分子化合物の原料として、あるいは、高分子化反応の触媒として使用可能である。このような化合物の例は、2,2'-アゾビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)、ビリルビン、イソアスコルビン酸、ケルセチン、ルチン、グアイアコール、4-メトキシフェノール、ピフェノール、4,4'-エチレンジアニリン、メチルハイドロキノ、エチルハイドロキノ、*o*-ヒドロキシ安息香酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、6-ヒドロキシ-2,4,5-トリアミノピリミジン、4,5,6-トリアミノピリミジン、2,3-ジヒドロキシピリダジン、3,6-ジヒドロキシピリダジン、2,3-ジヒドロキシピリジン、4-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸、メチル4-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸、4,5-ジアミノ-6-ヒドロキシ-2-メルカプトピリミジン、2,3-ジアミノピリジン、2,5-ジヒドロキシ-1,4-ベンゾキノ、2,5-ジヒドロキシ安息香酸、3,4-ジヒドロキシ安息香酸、3,4-ジヒドロキシ-3-シクロブテン-1,2-ジオン、3-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-L-アラニン、2-アミノ-3-ヒドロキシピリジン、3-アミノ-2-メトキシベンゾフラン、2,4-ジメトキシアニリン、2,5-ジメトキシアニリン、3,4-ジメトキシアニリン、2',5'-ジメトキシアセトフェノン、3',4'-ジメトキシアセトフェノン、1,4-ジメトキシベンゼン、バラトルール、2,3-ジメトキシ安息香酸、2,5-ジメトキシ安息香酸、バラトル酸、バラトルアルデヒド、バラトリルアミン、ホモバラトル酸、ホモバラトリルアミン、ホモバラトロニトリル、3,4-ジメトキシベンジルアルコール、3,4-ジメトキシケイ皮酸、3,4-ジメトキシシナモニトリル、2,3-ジメトキシフェノール、3,4-ジメトキシフェノール、3,4-ジメトキ

シフェネチルアミン、(3, 4-ジメトキシフェニル) 酢酸、3, 4-ジメトキシスチレン、(3, 4-ジメトキシフェニル) アセトニトリル、4-アリール-2-メトキシフェノール、2-メトキシ-4-プロフェニルフェノール、2-メトキシ-5-メチルアニリン、2-メトキシ-5-ニトロアニリン、4-メトキシ-2-ニトロアニリン、3-メトキシサリチル酸、3-メチルカテコール、4-メチルカテコール、メチルガレート、プロピルガレート、3, 4, 5-トリメトキシアニリン、3, 4, 5-トリメトキシフェノール、トロポロン、ブルプロガリン、サリチルアルドキシム、3-アミノ-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-2-ナフトール、1, 5-ジヒドロキシナフタレン、3, 5-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸、4-ヒドロキシ-1-ナフタレンスルホン酸、ブルプリン、2, 3-ジヒドロ-9, 10-ジヒドロキシ-1, 4-アントラセンジオン、各種のアゾ系染料、及びこれらの化合物の誘導体である。

【0037】また、高分子化合物の物性を調節する目的で、これらの化合物を複数組み合わせることも可能である。また、本発明によって高分子化合物を製造する際に、同様の反応経路によって高分子化されるキノン化合物を共存させることもできる。このようなキノン化合物の例は、アンスラキノン-2-スルホン酸、アンスラキノン-1, 5-ジスルホン酸、アンスラキノン-2, 6-ジスルホン酸、アンスラキノン-2-カルボン酸、1-アミノアンスラキノン、2-アミノアンスラキノン、アンスラルフィン、アミノナフトキノン、1, 8-ジヒドロキシアンスラキノン、カムフォキノン、デヒドロアスコルビン酸、2-ヒドロキシ-1, 4-ナフトキノン、イサチン、5-ニトロイサチン、各種のアンスラキノン系染料である。また、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸などの不飽和脂肪酸、または、オレイルアルコールなどの不飽和アルコール、または、スクアレンなどの不飽和アルキル、さらには桐油、あまに油、ヒマシ油などの乾性油といった自動酸化される物質を共存させ、酵素反応と同時に酸化、重合を行うことも可能である。

【0038】〔高分子化反応方法及びその利用方法〕アルカリ pH 域に至適反応 pH を有する新規なポリフェノールオキシダーゼの用途としては、例えば、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物の高分子化反応への適用がある。本発明方法による分子量の増大したフェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物の製造における、これら化合物の濃度は 0.01~90 重量%、好ましくは 1~80 重量%である。また、反応温度は 0~100℃、好ましくは 0~70℃である。さらに、反応の pH は 5~11、好ましくは 6~10、より好ましくは 7~9 で

ある。

【0039】また、使用する酵素活性濃度は 1~10,000 U/リットル、好ましくは 10~2000 U/リットルである。酵素活性濃度は、目的によって調整することが望ましい。すなわち、速やかな高分子化およびゲル化または固化を達成したい場合には高い活性濃度で反応を行えばよい。一方、低い活性濃度で反応を行えば穏やかな高分子化反応が進行し、液状物質としてより均一な高分子溶液を得ることができ、さらに反応を続行すると、穏やかなゲル化反応が反応液全体にわたって進行する。適当な重合度に至った時点での反応の停止は、NaOH、NH₃、Na₂CO₃、CaCO₃などのアルカリやアルカリ塩の添加、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸、炭酸、ホウ酸、有機酸などの酸の添加、既知の酵素阻害剤の添加、100℃、15分間といった加熱処理、あるいは酸素供給の遮断によって実施できる。また、ゲル化したフェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物は、所望により 50~230℃で加熱することにより、再び溶解させることが可能である。こうした熱溶解性は、分散剤、接着剤、塗料などの用途に用いるときに有用な性質である。また熱溶解後に熱水などを添加し、分散・溶解させることで、非常に分子量の高い化合物を、溶液として得ることが可能である。

【0040】また、本発明方法による、金属焼結体、鋳造品、合金、ダイカスト品、セラミックス、レンガ、コンクリート、木材、木質加工材、モミ、藁、籾、竹材、合成樹脂の発泡体といった多孔質物品処理において、ポリフェノールオキシダーゼとフェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物の双方を含浸し、多孔質物品中で高分子化反応を行う場合、含浸前の処理液の状態ではゲル化または固化せず、含浸後の多孔質物品中で処理液が乾燥濃縮される際にゲル化及び固化が進行することが望ましい。このためのフェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物の処理液中の濃度は、0.01~50 重量%、好ましくは 0.1~30 重量%である。また、反応温度は 0~100℃、好ましくは 10~70℃である。さらに、反応の pH は 5~11、好ましくは 6~10、より好ましくは 7~9 である。また、使用する酵素活性濃度は 1~10,000 U/リットル、好ましくは 10~2000 U/リットルである。適当な重合度に至った時点での反応の停止は、NaOH、NH₃、Na₂CO₃、CaCO₃などのアルカリやアルカリ塩の含浸、塩酸、硫酸、硝酸などの酸の含浸、既知の酵素阻害剤の含浸、100℃、15分間といった加熱処理、あるいは、多孔質物品表面への塗装やフィルムなどによる包装による酸素供給の遮断によって実施できる。

【0041】また、酵素重合反応の効果をさらに増大させる目的で、ポリフェノールオキシダーゼと、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物、さらには不飽和脂肪酸、不飽和アルコール、不飽和アルキル化合物、乾性油といった不飽和化合物を共に、高分子化反応を行うことで、酵素あるいは自動酸化によるフェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物の重合反応と、不飽和化合物の自動酸化に基づく重合反応を同時に行い、より強固な複合物を得ることが可能となる。こうした目的で使用される不飽和化合物の処理液中の濃度は、0.001 ~ 60 重量%、好ましくは0.01 ~ 40 重量%である。

【0042】本発明によりポリフェノールオキシダーゼを多孔質物品に加圧及び/または減圧により含浸し、木材中に既に含まれているリグニンなどのポリフェノール化合物のように、多孔質物品中に既に含まれているポリフェノール化合物、芳香族アミン化合物などを多孔質物品中で高分子化することにより、例えば多孔質物品が木材の場合は、木材含浸処理後の乾燥工程での作業性の向上、木材蒸煮処理あるいは高温蒸気注入処理によるリグニン分解で低下した木材強度の向上、乾燥時あるいは凍結時の木材割れを防止する作用の向上、木材中の嫌気性環境の維持・向上による微生物の繁殖抑制が可能となる。

【0043】また、多孔質物品中での酵素重合反応の効果をより増大させる目的で、ポリフェノールオキシダーゼと、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物を共に、加圧及び/または減圧により多孔質物品中に含浸し、多孔質物品中で高分子化反応を行うことで、ポリフェノールオキシダーゼが作用する物質を含有しないか、もしくは含有量の少ない多孔質物品の有効な処理を可能とし、しかも、酵素的な高分子化反応は、主に多孔質物品内部で進行するため、反応液組成物の分子量が比較的低い状態、すなわち比較的低い状態の処理液を用いて、多量の処理液を容易に含浸させることができる。特に、多孔質物品中に、ポリフェノールオキシダーゼが作用できるリグニン等の物質が既に存在、固定化されている場合は、これが多孔質物品中での酵素作用によって、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物と反応、重合する結果、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物から生成する高分子物はより強固に多孔質物品中に固定化される。

【0044】本発明の目的で実施される加圧または減圧は、処理液の含浸の困難な様々な種類の多孔質物品に十

分な量の処理液を注入し、必要な処理効果を得るために、極めて重要である。加圧操作は、大気圧である1気圧から20気圧、より望ましくは3から15気圧の範囲で実施されるが、酵素の活性が失われないならば、より大きな圧力を加えることも可能である。また、減圧操作は、真空圧までの範囲でいかなる圧力でも実施可能であるが、含浸の困難な多孔質物品の有効な処理のためには、100 ~ 760 mmHg の範囲での減圧が望ましい。また減圧操作は、多孔質物品に処理液を加える前に減圧を実施する前排気の方法がより望ましい。また、多孔質物品中により多量に処理液を含浸させるために、これらの加圧操作及び減圧操作を組み合わせることも有効である。

【0045】多孔質物品が木材の場合、通常用いられる様々な、加圧及び/または減圧処理方法が使用可能であり、具体的には、充細胞法（ベセル法）、半空細胞法（ローリー法）、複式真空法（ダブルバキューム法）、加減圧交替法（Oscillating Pressure Method）、及びこれらの操作を組み合わせた方法が適用可能である。また、インサイジング加工法もまた、含浸量を増大させるために適用可能である。また、含浸の困難な多孔質物品の前処理として、ローラー等を用いる圧縮処理、マイクロ波加熱、凍結処理、蒸煮処理、水蒸気処理、あるいは熱処理を行うことも有効である。元来、リグニンは木材の芯材中に多く含有され、これにより腐朽菌や白蟻に対する抵抗性を増大させていることが知られている。従って、本発明のフェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物として、特にリグニンもしくはリグニン誘導体を用い、これを木材保存剤として利用する場合、本発明の処理方法は、本質的に自然の生木の行っている腐朽菌や白蟻に対する防御方法を、あらゆる木材に対して工業的な処理方法として効率良く実施することを可能とするものであり、本発明は極めて有用である。

【0046】リグニン、あるいはリグニンスルホン酸もしくはリグニンスルホン酸塩は、アルカリ蒸解パルプあるいは亜硫酸パルプの工程から生成した状態では、様々な水不溶性の固形成分を含有している。そのため、多孔質物品に対し、ポリフェノールオキシダーゼと、リグニン、あるいはリグニンスルホン酸もしくはリグニンスルホン酸塩を含浸し、多孔質物品中で高分子化反応を行う場合、本発明の目的で多孔質物品中への処理液の含浸量を増大させるためには、これらのパルプ廃液中の水不溶性の固形成分を除去することが望ましい。除去処理は、含浸処理を行う多孔質物品の種類、含浸処理の目的、除去に伴う経済性に応じて、遠心分離、ろ過、及び静置等の方法により実施される。例えば、木材に対して加圧注入処理を行う目的では、パルプ廃液中の直径あるいは長さ1 μ m以上、望ましくは0.5 μ m以上、より望まし

くは $0.1 \mu\text{m}$ 以上の大きさの水不溶性の固形成分の除去を、ろ過によって行うことが望ましい。また、限外ろ過により脱塩・脱糖したものや、あるいは、さらに含浸性を高めるために、分子量 0.5 万～ 10 万以下などのより低分子の画分を用いることも可能である。また、脱糖は酵母などの微生物によっても実施可能である。また、本発明の目的で使用するリグニン誘導体は、リグニンスルホン酸の他に、リグニンもしくはリグニンスルホン酸を、酢酸エステル化、プロピオン酸エステル化、カルボキシメチルエーテル化、2-ヒドロキシエチルエーテル化、2-アセトキシエチルエーテル化あるいは2-ヒドロキシプロピルエーテル化したものや、さらにこれらのリグニンもしくはリグニン誘導体を加水分解したものが使用可能であり、また、これらの混合物も使用可能である。

【0047】本発明において使用されるフェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物の中で、特にリグニン、リグニンスルホン酸、フミン酸、ニトロフミン酸、タンニン、カテキン、没食子酸、ウルシオール、ヘスペリジン、ヒノキチオールなどの天然物もしくは天然物誘導体は、環境や人体への安全性が高いため有用性が高い。

【0048】また、多孔質物品中での高分子化反応処理の前処理もしくは後処理として、薬剤を多孔質物品に塗布あるいは含浸することも、有効である。特に、薬剤を多孔質物品内部に封止する目的、特に、無機化合物の多孔質物品表面への移行を防止する目的で、薬剤を多孔質物品に塗布あるいは含浸する第1段階と、ポリフェノールオキシダーゼと、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物の双方を、加圧及び／または減圧により多孔質物品中に含浸する第2段階を経て実施する多孔質物品処理法は有用である。また、逆に、ポリフェノールオキシダーゼと、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物との相互作用を利用して、薬剤を多孔質物品内部に固定する目的で、薬剤を多孔質物品に塗布あるいは含浸する第2段階を経て実施する多孔質物品処理法も、有効な薬剤処理のために有用である。単にフェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物を多孔質物品に含浸させた場合に比べ、このような前処理もしくは後処理と組合せた本発明の方法によれば、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化

フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物が酵素触媒反応によって多孔質物品中に重合固定されているため、薬剤をより強固に固定化することが可能である。

【0049】また、処理液を多孔質物品に含浸させた後、減圧処理を行い、処理液の一部を多孔質物品外に回収する方法や、処理された多孔質物品内部での重合反応が十分に進行する前に、多孔質物品の洗浄を水等を用いて行い、未重合物を除去することで、多孔質性の保持される程度を容易に調整することが可能である。このような多孔質性の保持、調整された処理物は、湿度調整能力、保水力、吸着能力、イオン交換能を保持しており、こうした能力を利用する様々な用途への利用が可能である。また、多孔質性の保持された処理物に対して、さらに、薬剤、ポリマー、プレポリマーを含浸させ、様々な複合された性質を有する多孔質物品が製造可能である。

【0050】本発明の多孔質物品処理の効果を増大する目的や、多孔質物品内部で重合したフェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物による薬剤固定能や薬剤徐放能を有効に活用する目的で、様々な芳香剤、消臭剤、防錆剤、難燃化剤、抗菌剤、防腐剤、殺菌剤、防虫剤、抗ウィルス剤、生物忌避剤といった様々な薬剤による処理が、ポリフェノールオキシダーゼによる多孔質物品処理の前処理、同時処理、あるいは後処理として実施可能である。この目的で使用される薬剤は、既存の多くの薬剤が使用可能である。使用可能な薬剤は水溶性の薬剤のみならず、分散剤あるいは界面活性剤の添加により、O/W型あるいはW/O型のエマルジョンを形成するものや、微粉体として水溶液中に分散するものも利用可能である。

【0051】こうした目的で使用される界面活性剤としては、例えば直鎖または分岐アルキルあるいはアルケニル硫酸塩、アミド硫酸塩、直鎖または分岐鎖のアルキル基またはアルケニル基を有し、エチレンオキシド、プロピレンオキシド及びブチレンオキシドのうちの単独あるいは複数成分が付加したアルキルまたはアルケニルエーテル硫酸塩のような脂肪族硫酸化物、アルキルスルホン酸塩、アミドスルホン酸塩、ジアルキルスルホコハク酸塩、 α -オレフィン、ビニリデン型オレフィン及び内部オレフィンの各スルホン酸塩のような脂肪族スルホン酸塩、直鎖または分岐鎖のアルキルベンゼンスルホン酸塩のような芳香族スルホン酸塩、直鎖または分岐鎖のアルキル基またはアルケニル基を有し、エチレンオキシド、プロピレンオキシド及びブチレンオキシドのうちの単独あるいは複数成分が付加したアルキルまたはアルケニルエーテルカルボン酸塩またはアミド、 α -スルホ脂肪酸塩またはエステル、アミノ酸型界面活性剤、アルキルまたはアルケニル酸性リン酸エステル、アルキルまたはアルケニルリン酸塩のごときリン酸エステ

ル系界面活性剤、スルホン酸型両性界面活性剤、ベタイン型両性界面活性剤、直鎖または分岐鎖のアルキル基またはアルケニル基を有し、エチレンオキシド、プロピレンオキシド及びブチレンオキシドのうちの単独あるいは複数成分が付加したアルキルまたはアルケニルエーテルあるいはアルコール、直鎖または分岐鎖のアルキル基またはアルケニル基を有し、エチレンオキシド、プロピレンオキシド及びブチレンオキシドのうちの単独あるいは複数成分が付加したポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、高級脂肪酸アルカノールアミドまたはそのアルキレンオキシド付加物、ショ糖脂肪酸エステル、脂肪酸グリセリンモノエステル、アルキルまたはアルケニルアミノオキシド、テトラアルキルアンモニウム塩型カチオン界面活性剤などが挙げられる。また、分散剤は従来知られている多くのものが使用可能であり、特に、リグニン、リグニンスルホン酸、あるいはリグニンスルホン酸塩は、ポリフェノールオキシダーゼによる高分子化反応の原料であるばかりでなく、これらの物質自体に薬剤分散作用があるため、本発明の目的のために極めて有用である。

【0052】本発明の目的で使用する上記の薬剤の内、抗菌剤、防腐剤、殺菌剤、防虫剤、抗ウィルス剤、あるいは生物忌避剤として、銅、砒素、亜鉛、クロム、ニッケル、アルミニウム、モリブデン、マグネシウム、あるいは銀の金属塩、金属化合物、あるいは金属錯体の溶液もしくは微粉体を用いることができる。具体的には、陰イオン部分が F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 NO_3^- 、 BO_3^{3-} 、 PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 、 CO_3^{2-} 等から成る金属塩、ナフテン酸、オレイン酸等のカルボン酸あるいはスルファミン酸と金属イオンとの化合物、金属酸化物、金属酸化物イオン、あるいはこれらの複合体が挙げられる。また、他にも臭化カルシウム、臭化ナトリウム、臭化マグネシウム、臭化カリウム、ヨウ化ナトリウム、フッ化ナトリウム、フッ化カリウム、ケイフッ化ナトリウム、ケイフッ化マグネシウム、硫化ナトリウム、硫化カリウム、セレン酸カリウムなども使用可能である。

【0053】また金属と錯体を形成するために添加される化合物として、従来知られている多くの化合物が使用可能であるが、例えば、ピロカテコール、没食子酸、ヒノキチオール、カテキン、ピロガロール、 α -フェニレンジアミン、2-アミノフェノール等のフェノール性化合物もしくは芳香族アミン化合物、エタン-1、1-ジホスホン酸及びその誘導体、エタンヒドロキシー-1、1、2-トリホスホン酸、エタン-1、2-ジカルボキシー-1、2-ジホスホン酸、メタンヒドロキシホスホン酸などのホスホン酸、2-ホスホノブタン-1、2-ジカルボン酸、1-ホスホノブタン-2、3、4-トリカルボン酸、 α -メチルホスホノコハク酸などのホスホノカルボン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、2-アミノイソ酪酸などのアミノ酸あるいはアミノ

酸類似体、ニトリロ三酢酸、エチレンジアミン四酢酸、ジエチレントリアミン五酢酸などのアミノポリ酢酸、ポリアクリル酸、ポリイタコン酸、ポリマレイン酸、無水マレイン酸共重合体、カルボキシメチルセルロースなどの高分子電解質、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコールなどの非解離高分子、ジグリコール酸、オキシジコハク酸、カルボキシメチルオキシコハク酸、グルコン酸、クエン酸、乳酸、酒石酸、ショ糖、ラクトースなどのカルボキシメチル化物、ペンタエリスリトールのカルボキシメチル化物、グルコン酸のカルボキシメチル化物、ベンゼンポリカルボン酸、シュウ酸、リンゴ酸、オキシジコハク酸、グルコン酸などの有機酸、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トリエチレンテトラミン、ポリエチレンイミン、トリイソプロパノールアミンなどの有機アルカリ剤、デンプン、尿素、キトサン、ポリリシンなどの有機物質が挙げられる。

【0054】上記のヒノキチオールは、各種金属錯体もしくは塩として使用可能であり、具体的には、銅、砒素、亜鉛、クロム、ニッケル、アルミニウム、モリブデン、マグネシウム、カルシウム、バリウム、鉄あるいは銀との錯体、もしくはナトリウム塩が挙げられる。特に、銅、砒素、亜鉛、クロム、ニッケルあるいは銀との錯体は、ヒノキチオールの有する抗菌などの生理的作用に金属の作用を加えることができるため、本発明の目的のために有用である。また金属粉末については、目的によって様々な大きさの金属微粒子からなる粉末が使用可能であるが、例えば、木材に対して含浸処理を行う場合は、 $5\mu m$ 以下、望ましくは $0.5\mu m$ 以下、より望ましくは $0.1\mu m$ 以下の直径を有する微粒子からなる粉末が使用可能である。

【0055】また、金属塩、金属化合物、あるいは金属錯体による多孔質物品の処理は、ポリフェノールオキシダーゼによる多孔質物品処理の前処理、後処理、同時処理のいずれの処理方法も可能であり、ポリフェノールオキシダーゼによる重合反応を阻害する程度、酵素反応条件での溶解度、処理剤に混和したときの凝集・沈降の有無、処理の目的等に応じて、様々な方法あるいは様々な組み合わせで実施することができる。金属塩、金属化合物、もしくは金属錯体の処理液中の濃度は、使用する金属の有する生理活性の強度と処理の目的に応じて調整することが望ましいが、例えば、銅、ヒ酸、もしくは亜鉛の場合は、通常 $0.01\sim 500\text{ mM}$ 、好ましくは $0.1\sim 200\text{ mM}$ である。また、ホウ素塩、ホウ素系化合物、あるいはホウ素含有錯体の溶液もしくは微粉体も、難燃化剤、抗菌剤、防腐剤、殺菌剤、防虫剤、抗ウィルス剤、あるいは生物忌避剤として使用可能であり、具体的には、ホウ酸、ホウ砂、ホウフッ化銅が挙げられる。また、ピレスロイド系薬剤、コナゾール系薬剤、あるいは昆虫ホルモン系の薬剤なども本発明の薬剤として利用可

能である。これらの揮発性薬剤が、本発明による多孔質物品への薬剤徐放性の付与、向上により、より長期間、効力を維持することが可能となる。

【0056】また、芳香剤、消臭剤、防錆剤、抗菌剤、防腐剤、殺菌剤、防虫剤、抗ウイルス剤、あるいは生物忌避剤として、植物由来の抽出物、抽出成分、あるいは植物抽出成分と同等の構造を有する合成物を使用することができる。このような植物の具体例は、ヒノキ、青森ヒバなどの樹木、香草、カラシ、ワサビ、竹、イリオモテアザミ根茎、あるいはヤエヤマヤシ根などであり、これらの植物体を、粉碎、圧搾、煮沸、あるいは水蒸気蒸留などにより処理することで、抽出物や抽出成分を得ることが出来る。植物由来の抽出成分、あるいは植物抽出成分と同等の構造を有する合成物の具体的な例は、ヒノキチオールなどのトロポロン類、 α -ピネン、 β -ピネン、カンファ、メントール、リモネン、ボルネオール、 α -テルピネン、 γ -テルピネン、 α -テルピネオール、テルピネン-4-オール、シネオールなどのモノテルペン類、 α -カジノール、 ϵ -ムロールなどのセスキテルペン類、カテキン、タンニンなどのポリフェノール類、2, 3, 5-トリメチルナフタレンなどのナフタレン誘導体、シトロネロールなどの長鎖脂肪族アルコール、シンナムアルデヒド、シトラール、ペリラルデヒドなどのアルデヒド類、アリルイソチオシアネートなどのアリル化合物などが挙げられる。また、樹木を蒸し焼きすることで得られる木酢液も使用可能である。

【0057】これらの抽出物、抽出成分、あるいは植物抽出成分と同等の構造を有する合成物は、元来、植物体内部に存在するものであるため、多孔質物品が木材、木質加工材、木片、木粉、モミ、藁草、藁、竹材、繊維、紙、あるいはパルプといった植物由来の物品である場合、さらにはポリフェノールオキシダーゼが作用する高分子化反応の原料がリグニンあるいはリグニン誘導体といった植物由来成分である場合、重合物による多孔質物品中の空隙の封止作用に加えて、植物由来の抽出物、抽出成分、あるいは同等の構造を有する合成物とこれらの多孔質物品や反応原料との相互作用により、薬剤の溶脱抵抗性や徐放性といった望ましい効果を得ることが可能となる。また、特に、これらの天然物の組合せによって製造される多孔質物品の処理物は、環境や人体に対する高い安全性や、生物親和性を有するため、様々な分野で多くの用途展開が可能である。

【0058】また、防錆剤、抗菌剤、防腐剤、殺菌剤、防虫剤、抗ウイルス剤、あるいは生物忌避剤として、水酸基、アミノ基、ハロゲン、ニトロ基から選ばれる置換基を1つあるいは複数有する芳香族化合物あるいは環状化合物を使用することができる。これらの芳香族化合物においても、上記の植物由来の抽出物、抽出成分、あるいは植物抽出成分と同等の構造を有する合成物の場合と同様の原理で、薬剤の溶脱抵抗性や徐放性といった望ま

しい効果を得ることができる。

【0059】水酸基、アミノ基、ハロゲン、ニトロ基から選ばれる置換基を1つあるいは複数有する芳香族化合物あるいは環状化合物の具体的な例は、 o -フェニルフェノール、1-ナフトール、2-ナフトール、 o -クロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、4, 6-ジニトロ- o -クレゾール、ペンタクロロフェノール、2, 3, 5-トリクロロフェノール、2, 4, 6-トリクロロフェノール、モノクロロナフタレン、トリクロロナフタレン、テトラクロロナフタレン、2, 4, 5-トリクロロフェニルラウレートモノクロロナフタレン、クロロニトロフェノール、クロロニトロトルエン、 o -ジクロロベンゼン、1, 3, 5-トリクロロベンゼン、1, 2, 4-トリクロロベンゼン、2, 4, 6-トリブロモフェノール、4-ブロモ-2, 5-ジクロロフェノール、ブロモ- o -フェニルフェネート、4-クロロフェニル-3-ヨードプロパギルホルマル、クレオソート油、塩素化テルペン、ブチルヒドロキシアニソール、ブチルヒドロキシトルエン、安息香酸、 p -ヒドロキシ安息香酸、 p -ヒドロキシ安息香酸のメチル、エチル、プロピル、ブチル、イソブチル、イソプロピルなどのエステルなどである。また、チオファメートメチル、ダスバン、ダイアジノン等の有機リン系化合物、クロルデン、ディルドリン、アルドリン、ヘプタクロル等のシクロジエン系化合物、バイゴン、ジメチラン、セビン等のカーバメイト系化合物、 N -ニトロソ- N -シクロヘキシルヒドロキシルアミン等のニトロソ化合物、デヒドロ酢酸、ソルビン酸も、抗菌剤、防腐剤、殺菌剤、防虫剤、抗ウイルス剤、あるいは生物忌避剤として、本発明の目的に使用可能である。

【0060】本発明の多孔質物品処理による寸法安定性、割れ防止性、調湿性、吸水性、撥水性、表面平滑性の付与あるいは向上は、多孔質物品中に生成する高分子物の親水性あるいは疎水性を調整することで達成される。例えば、リグニンスルホン酸の高分子化物は多孔質物品中で親水性の高分子ゲルへと重合されるが、他の処理剤成分として、例えば不飽和脂肪酸、不飽和アルコール、不飽和アルキル化合物、乾性油などの不飽和化合物を併用することで疎水性を向上させることができる。また、水酸基の他に炭素数が1から22の飽和あるいは不飽和のアルキル側鎖を置換基として有する芳香族化合物、具体的にはウルシオールを、ポリフェノールオキシダーゼによって重合させる主成分として使用するか、あるいはリグニンやリグニン誘導体に添加して使用することも疎水性を向上させることができる。また、水酸基及び/またはアミノ基の他に、ポリオキシエチレンもしくはポリエチレンイミンを構造部分とする置換基を有するフェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物を、ポリフェノールオキシダーゼ

によって重合させる主成分として使用するか、あるいはリグニンやリグニン誘導体に添加して使用することにより、処理後の多孔質物品の保水性を向上させることができ、特に木材処理においては、寸法安定性、及び割れ防止性を付与あるいは向上させることが可能である。

【0061】特に、リグニンやリグニン誘導体などのフェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物をポリフェノールオキシダーゼによって重合される主成分として使用する場合は、ポリオキシエチレン、ポリエチレンイミン、もしくは炭素数が1から22の飽和あるいは不飽和のアルキル鎖を構造部分とする置換基を有する芳香族化合物を、重合物の物性の改変のための添加剤として使用可能である。なお、ポリオキシエチレンもしくはポリエチレンイミンを構造部分とする置換基を有する芳香族化合物は、水酸基、アミノ基、カルボキシ基などを構造部分として有する芳香族化合物にエチレンオキシドあるいはエチレンイミンを作用させることで得られる。また、バニリン、*o*-バニリン、3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒド、ベンズアルデヒド、2-フェニルプロピオンアルデヒドなどのアルデヒド基を芳香環上の置換基、あるいは芳香環上の置換基の構造の一部として有する芳香族化合物にポリエチレンイミンを作用させ、シッフ塩基を生成させることによって得られる。

【0062】本発明の多孔質物品処理によるイオン交換性の付与あるいは向上は、多孔質物品中に生成する高分子物のアニオン性あるいはカチオン性を調整することで達成される。例えば、リグニンスルホン酸の高分子化物はカチオン交換能を有するため、木材、木質加工材、木片、木粉、モミ、藁草、蘆、竹材、繊維、紙、パルプといった植物由来の多孔質物品のカチオン交換能を向上させることが可能である。また、アニオン交換能の付与あるいは向上のためには、*o*-フェニレンジアミン、*p*-フェニレンジアミン、3,4-ジアミノベンゾフェノン、*o*-アミノフェノール、*p*-アミノフェノール、1,2-ジアミノアンスラキノ、1,4-ジアミノアンスラキノなどのアミノ基を有する芳香族化合物、四級アンモニウム塩、ポリアリルアミン、あるいはポリエチレンイミンを構造部分とする置換基を有する芳香族化合物をリグニンあるいはリグニン誘導体に添加して使用することや、芳香族アミン化合物をポリフェノールオキシダーゼによって重合することで達成できる。

【0063】本発明の多孔質物品処理によるホルムアルデヒド吸収性の付与あるいは向上は、本発明の多孔質物品処理による封止能によって実施可能である。また、ホルムアルデヒド吸収性のさらなる向上のためには、上記のアニオン交換能の付与あるいは向上のために用いる処理を行い、ホルムアルデヒドを処理剤中のアミノ基と反応させることによって達成可能である。また、カテキン

などのポリフェノール物質、あるいはポリフェノール物質の酸化物は、メチルメルカプタン、トリメチルアミン、アンモニア、さらにはタバコ臭などの悪臭物質との反応などにより、これらを消臭することが知られており、消臭を目的とした本発明の利用のために有用である。こうしたガス状物質との反応は、反応場の表面積が大きいほど効率よく進むため、本発明の多孔質物品処理方法を用いることで、消臭効果の高い物品を製造可能である。

【0064】本発明の多孔質物品処理による難燃性の付与あるいは向上のための薬剤には、従来知られている多くの難燃剤が使用可能であるが、例えば、Na、K、Mg、Ca、Ba、Al、Zn、Cu、Mn、Ni、Si、Sn、Pbなどの元素をカチオン部分に有する、リン酸塩、リン酸水素塩、硫酸塩、硫酸水素塩、炭酸塩、ホウ酸塩、ケイ酸塩、硝酸塩、フッ化物、塩素化物、臭化物、水酸化物などが挙げられ、具体的には、水酸化アルミニウム、水酸化マグネシウム、水酸化ジルコニウム、三酸化アンチモン、メタホウ酸バリウム、酸化錫、赤リン、リン酸アンモニウムが挙げられる。特に、本発明のフェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物として、リグニンスルホン酸を利用する場合、パルプ工場における蒸解プロセスが主に、亜硫酸カルシウムあるいは亜硫酸マグネシウムにより行われる結果、得られるリグニンスルホン酸中には炭酸カルシウム、水酸化カルシウム、炭酸マグネシウム、あるいは水酸化マグネシウムなどの微粉末が存在している。本発明の多孔質物品処理により、これらの微粉末を難燃化剤として有効に利用することが可能である。

【0065】本発明の多孔質物品処理を利用して、例えば、木片、木粉、モミ、藁草、蘆、竹材、繊維、紙、パルプなどの生分解性を有する天然物由来の材料から容器を製造することが可能である。これらの容器は目的に応じて、調湿性、吸水性、撥水性、表面平滑性、生物親和性、イオン交換性を調整することが望ましい。また、本発明は酵素的な重合方法を利用するため、人体、環境に対する安全性が高く、製造される容器は広範な分野での使用が可能である。また、土壤中、コンポスト中などでの生分解性が求められる分野において特に有用であり、本発明の容器を、例えば園芸用ポットに用いれば、容器内で育苗可能であると共に、容器と一緒にそのまま地面に移植しても、容器は徐々に生分解するため、移植時の労力を削減可能である。

【0066】本発明の多孔質物品処理による着色は、*o*-フェニレンジアミン、*p*-フェニレンジアミン、カテコール、没食子酸、ケルセチンなどのポリフェノールオキシダーゼが作用できる染料あるいは染料前駆体とポリフェノールオキシダーゼを木材に作用させることにより、木材中で着色物質を生成すること、あるいは着色物

質と木材中に既に含まれているリグニンなどのポリフェノール化合物を木材中で複合高分子化し、木材を強固に染色・着色処理することにより達成される。なお、上記の木材染色・着色処理において、多くのポリフェノールオキシダーゼは木材中の着色物質であるリグニンを漂白することが知られており、本発明の木材染色・着色処理は、酵素的な漂白と染色・着色処理を同時に行うことができるため、工程の短縮、色調の向上が図られ極めて有用である。また、ポリフェノールオキシダーゼと、リグニン、もしくはリグニンスルホン酸、リグニンスルホン酸塩などのリグニン誘導体を木材処理に用いることで、木材の芯材部分と辺材部分の色調、色度の差を小さくし、より均一で、自然な風合いの着色を有する木材を得ることができる。

【0067】また、本発明のポリフェノールオキシダーゼを、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物と共にコンクリートに添加し、これらの化合物をコンクリート中で高分子化することにより、スランプロスの改善、コンクリート強度の向上、コンクリート中の酸素濃度の低下による鉄筋のサビ抑制が可能である。

【0068】また、本発明のポリフェノールオキシダーゼを、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物と共に土壤中に添加し、これらの化合物を土壤中で高分子化することにより、土壌の有する団粒構造の維持・向上、保水性向上、抗菌剤あるいはウィルス感染阻止剤の徐放性の向上、種子吹付表土安定性の向上、植物体の支持力の向上、発塵抑制性の向上、畝・斜面などでの風雨による土壌・土砂・砂礫などの崩壊を防止する作用の向上、アスファルト敷設前の土砂・砂礫の固定性向上といった高分子化合物散布による効果が得られる。しかも、本発明により、散布時には高分子化反応が十分には進んでいない状態として、散布液の粘性を抑えることができ、このことは実際に用いる場合のハンドリングをより容易なものとするとともに、散布液の地下への浸透性を向上させることができ、さらには、散布後の土壌表面での速い高分子化反応により、散布表面の粘着性を抑制することができる。

【0069】本発明の多孔質物品の処理剤は、組成物として前述のごとく、ポリフェノールオキシダーゼ、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、芳香族アミン化合物、不飽和化合物、薬剤などを構成成分として含むが、その必要に応じてさらにpH調整剤、色素、高分子化合物、比重調整剤、固形物などを含ませることができる。本発明による高分子化反応は、ポリフェノール酸化作用を有する酵素を酸化触媒とするものであり、空気中の酸素を酸化剤として使用でき、このことは本発明の広

範な利用分野への適用を可能にする。また、高分子化合物を大量に生産する場合には、反応液の機械的な攪拌や、空気あるいは酸素を反応系に加える操作が有効である。また、反応液にペルオキシダーゼと過酸化水素、もしくは過酸化水素の代わりに過酸化水素を生成できるオキシダーゼとその基質を添加し、酸素を酸化剤とする本発明の反応と、過酸化水素を酸化剤とする反応を同時に進行させることも可能である。

【0070】本発明の多孔質物品の処理剤は、上記の組成物を粉末もしくは造粒された粉末として混合することにより一剤として調製することができる。造粒は、発塵性を抑えるための、あるいは処理剤の保存性や使用目的によっては使用上の利便性などの目的で行われる賦形であり、具体的には、マルメ造粒、押し出し造粒、流動造粒、遠心流動造粒等の造粒操作によって行うことができる。この場合、処理剤中のポリフェノールオキシダーゼの保存安定性を向上させるため、酵素を他の処理剤成分とは別に酵素安定剤と共に造粒することも有効である。また、本発明の多孔質物品の処理剤は、使用時に希釈を行うことを前提とした高濃度溶液、あるいは希釈なしで使用できる濃度の溶液の何れの方法でも調製可能である。この場合、処理剤組成物が使用前に酸化されることを防ぐため、処理剤保存時には処理剤を含む容器を密栓し、外気との接触を避けることが望ましい。また、処理剤の製造時に、窒素ガス、不活性ガスの使用や、脱気などにより酸化を抑制することがより望ましい。また、本発明の多孔質物品の処理剤を調製する場合、フェノール化合物または芳香族アミン化合物、さらにはポリフェノールオキシダーゼを他の処理剤成分とは別に調製し、使用の直前に混合して使用することも可能である。

【0071】本発明において使用できる酸化剤としては、空気、酸素、オゾン、過酸化水素、過酸化水素前駆体、過酸前駆体、または過酸を、単独で、または複数組み合わせ用いることができる。酸化剤の内、過酸化水素前駆体は水に溶解してパーヒドロキシルイオンを生成するものである。このような物質には、1水和物もしくは4水和物のパーボレート、パーカルボネート、過ホウ砂、過ピロリン酸ナトリウム、過安息香酸、尿素-過酸化水素反応物、メラミン-過酸化水素反応物、クエン酸過水和物などがあり、特に好ましくはパーボレート、パーカルボネートである。またさらには、過酸化水素前駆体としてオキシダーゼ及びその基質による過酸化水素発生系を用いることもできる。このようなオキシダーゼの例は、グルコースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、グリセロールオキシダーゼ、アミンオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ、D-アミノ酸オキシダーゼ、アリールアルコールオキシダーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ソルボースオキシダーゼ、ウレートオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼなどがあり、特に好ましく

はグルコースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼである。

【0072】また過酸前駆体は、反応性アシル基を有する有機化合物もしくはカルボン酸エステル、カルボン酸無水物、酢酸塩であり、このような物質にはテトラアセチルエチレンジアミン (tetraacetylenediamine : TAED)、テトラアセチルメチレンジアミン (tetraacetylmethylenediamine : TAMD)、テトラアセチルグリコールウリル (tetraacetylglucuril : TAGU)、ジアセチルジオキソヘキサヒドロトリアジン (diacetyldioxohexahydrotriazine : DADHT)、ノナノイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウム (sodium nonanoyloxybenzenesulfonate : SNOBS)、イソノナノイルオキシベンゼンスルホン酸ナトリウム (sodium isononanoyloxybenzene sulfonate : ISONOBS)、コハク酸無水物、安息香酸無水物、フタル酸無水物、グルコースペンタアセテート (glucosepentaacetate : PAG)、キシローステトラアセテートがあり、特に好ましくは、TAED、SNOBSである。さらに過酸は、例えばジペルオキシドデカンジオン酸 (diperoxydodecane dioic acid : DPDDA)、ジペルオキシイソフタル酸 (diperoxyisophthalic acid)、モノペルオキシフタル酸マグネシウム・6水和物 (magnesium monoperoxyphthalate hexahydrate)、ノニルアミドペルオキシアジピン酸 (nonylamidoperoxyadipic acid : NAPAA) である。

【0073】【その他の利用方法】ポリフェノールを構造部分に有する天然物として、フラボノイド系、キサントン系、メラニン系などの植物色素やリグニンが知られており、ポリフェノールオキシダーゼはこれらの天然物に対する酸化作用を有する。また、毒性が問題になっているジクロロフェノール、トリクロロフェノール等のハロゲン置換フェノール (AOX) をもポリフェノールオキシダーゼは反応基質にできる。それ故に、例えばこれらの天然物や非天然物を含有する廃水処理においても本発明のポリフェノールオキシダーゼは有用である。

【0074】

【実施例】以下に本発明について代表的な例を示し、さらに具体的に説明する。ただし、これらは単なる例示であり、本発明はこれらのみに限られるものではない。また、以下の実施例において%とは特に記載しない限り重量%を表す。

【0075】実施例1：培養及び濃縮

2リットル容のフラスコ4器を培養装置に用い、1%グルコース及び0.2% NH_4Cl 、1.34% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.3% KH_2PO_4 、0.1% NaCl 、0.2%ペプトン、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.02mM CuSO_4 を含む500mlの培地に2N-NaOHを加えてpHを7.5としたものを各々のフラスコに調製し、スティルバ・s.p. (St 50

ilbellasp.) SD3101 (受託番号FERM P-15963) を接種し、27℃、100時間の振とう培養を行った。培養後、4℃での遠心分離により除菌された培養ブロスを得た。次に、この除菌された培養ブロスを、ミニタン・フィルターパケット (CAT. NO. : PTGCOMP04, ミリポア社製) を用いるミニタン限外ろ過システム (ミリポア社製) によって、分子量10,000以上の画分として濃縮した。

【0076】実施例2：粗精製

1. 34% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.3% KH_2PO_4 、0.1% NaCl によって平衡化したDEAE-Cellulofine A-800m (生化学工業 (株)) カラム ($\phi 60\text{mm}$, 330cc) の上部に、実施例1記載の濃縮された培養ブロスをカラム上部の空隙にアブライシ、さらに平衡化に使用したものと同組成の緩衝液、400mlによるカラム洗浄を行った。次に、1. 34% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.3% KH_2PO_4 、0.3% NaCl を1回に50mlずつ使用して、合計8回の溶出を行ったところ、ポリフェノールオキシダーゼ活性を2回目から5回目の画分に得た。これらの活性画分は、実施例1記載と同様の限外ろ過システムによって濃縮し、さらに、200ppm NH_4HCO_3 に対して透析後、凍結乾燥に供し、粗精製物を凍結乾燥物として得た。凍結乾燥物のポリフェノールオキシダーゼ活性は5U/mgであった。

【0077】実施例3：培養及び濃縮、粗精製

サゲノメラ・s.p. (*Sagenomella sp.*) SD3102 (受託番号FERM P-15964) の培養及び濃縮を実施例1と同様に行い、ポリフェノールオキシダーゼ活性を有する水溶液を得た。さらに、実施例2と同様の粗精製を行い、凍結乾燥物を得た。凍結乾燥物のポリフェノールオキシダーゼ活性は3.5U/mgであった。

【0078】実施例4：培養及び濃縮、粗精製

スタキリジウム・s.p. (*Stachyridium sp.*) SD3103 (受託番号FERM P-15965) の培養及び濃縮を実施例1と同様に行い、ポリフェノールオキシダーゼ活性を有する水溶液を得た。さらに、実施例2と同様の粗精製を行い、凍結乾燥物を得た。凍結乾燥物のポリフェノールオキシダーゼ活性は2.5U/mgであった。

【0079】実施例5：等電点の測定

実施例2～4で得たポリフェノールオキシダーゼ活性サンプルを用い、ロトフォア・システム (BIO-RAD社製) を用いる等電点電気泳動により、活性染色と等電点を測定した。バッファーにはファルマライト (pH2.5～5) (Sigma社から入手) を使用した。また、活性染色は、電気泳動終了後のゲル・プレートに、50ppmのシリングアルダジン (syringaldazine) と100mMのリン酸カリウムバッファー溶液 (pH8.2) を含む水溶液に浸漬し、ポリフェノールオキシダーゼによる反応の結果生じる赤紫色のバンドを観察することで行った。その

結果、ステイルベラ・s p. (*Stilbella sp.*) SD3101 (受託番号FERM P-15963)、サゲノメラ・s p. (*Sagenomella sp.*) SD3102 (受託番号FERM P-15964)、スタキリジウム・s p. (*Stachylidium sp.*) SD3103 (受託番号FERM P-15965) の等電点はそれぞれ、 6.6 ± 0.5 、 5.9 ± 0.5 、 7.0 ± 0.5 であった。

【0080】実施例6：基質特異性

実施例2～4記載の粗精製ポリフェノールオキシダーゼを用いて酸化反応の基質特異性を調べた。室温（25℃）において、0.05 mMの基質と0.1 Mのリン酸 10 カリウムバッファー（pH8.0）を含む溶液における酵素*

*添加、無添加での酸素消費速度の差を、マノメータ（YS 1 Model 5300 Biological Oxygen Monitor, Yellow Springs Instrument Co., Inc. 製）で測定することで行った。この測定ではアスコルビン酸を基質に用いた場合の酸素消費速度の差（ Δ 酸素消費速度）が最大であったため、この値を100として、相対値で結果を表1に示した。なお、対照として、市販アスコルビン酸オキシダーゼ（*Cucumis sp.* 由来、フナコシ（株）から入手）を用いて同様の測定を行った場合の結果も併せて示した。

【0081】

【表1】

基質	Δ 酸素消費速度（相対値）			
	SD3101	SD3102	SD3103	市販酵素
シリンガルダジン	9.9	2.7	4.5	ND
o- フェニレンジアミン	2.4	5.7	1.9	0.0
p- フェニレンジアミン	18.4	6.1	13.1	0.0
ピロカテコール	25.8	3.1	10.0	ND
ハイドロキノン	1.5	2.3	0.4	0.0
フェルラ酸	46.4	3.9	23.8	0.0
アスコルビン酸	100	100	100	100
ビリルビン	30.3	1.9	8.2	0.0
フェノール	4.3	0.7	0.2	0.0
アニリン	1.4	0.2	0.2	0.0

【0082】実施例7：分子量

分子量測定は、ゲル過クロマトグラフィー（GFC）を用いて行った。1.34% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.3% KH_2PO_4 、1% NaCl によって流速 1.0 ml/min で平衡化した GFC カラム（Shodex PROTEINKW-802.5、2連）と UV 検出器（280 nm）を用いる HPLC により、実施例2～4記載の粗精製ポリフェノールオキシダーゼの分析及び分取と活性測定を行ったところ、ポリフェノールオキシダーゼ活性ピークはそれぞれ、分子量 $76,000 \pm 5000$ 、 $33,000 \pm 5000$ 、 $55,000 \pm 5000$ の位置に溶出された。なお、分子量マーカー蛋白質として、オリエンタル工業（株）の MW-Marker（HPLC）を使用した。

【0083】実施例8：5リットル容フラスコでの培養及び粗精製

1% グルコース及び0.2% NH_4Cl 、1.34% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.3% KH_2PO_4 、0.1% NaCl 、0.2% ペプトン、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.02% MCuSO_4 からなる 1 リットルの培地に 2N- NaOH を加えて pH を 7.5 としたものを含む 5 リットル容のフラスコ、2 器に、ステイルベラ・s p. (*Stilbella sp.*) SD3101 (受託番号FERM P-15963) を接種し、28℃、5 日間の振とう培養を行った。培養後、4℃での遠心分離により除菌された培養ブロス 1.8 リットルを得た。次に、この培養ブロスの一部を、ミニタン・フィルターバケット（CAT. NO.: PTGCOMP04、ミリポア社製）を用いるミニタン限外ろ過システム（ミリポア社製）によって、分子量 10,000 以上の画分として濃縮した。これをさら

に、DEAE-Cellulofine A-800m カラムクロマトグラフィーに供し、溶出した活性画分を再び、上記のミニタン限外ろ過システムによって、分子量 10,000 以上の画分として再濃縮した。さらにこの再濃縮液を 200 ppm NH_4HCO_3 に対して透析後、凍結乾燥に供し、粗精製物を凍結乾燥品として得た。凍結乾燥品のポリフェノールオキシダーゼ活性は 8 U/mg であった。

【0084】また、同様の培養および粗精製操作により、サゲノメラ・s p. (*Sagenomella sp.*) SD3102 (受託番号FERM P-15964) およびスタキリジウム・s p. (*Stachylidium sp.*) SD3103 (受託番号FERM P-15965) の生産するポリフェノールオキシダーゼの凍結乾燥品を得た。活性はそれぞれ 5 U/mg、4.5 U/mg であった。

【0085】実施例9：従来のポリフェノールオキシダーゼとの混合

試薬として市販されているポリフェノールオキシダーゼ（*Rigidoporus zonalis* 由来、TaKaRa（株）から入手）と、実施例8記載の3種の凍結乾燥品を混合したものを、用いて様々な pH で活性測定を行ったところ、図11に示したように pH 4～10 の広範囲の pH において酸化反応が速やかに進行した。

【0086】実施例10：高分子化反応

リグニンスルホン酸ナトリウム塩（アルドリッチ・ケミカル・カンパニー（Aldrich Chemical Company, Inc.）から入手）を 30%（W/V）、ポリフェノールオキシダーゼとして、実施例8記載のステイルベラ・s p. (*Stilbella sp.*) SD3101 (受託番号FERM P-15963) から得た

凍結乾燥品を300 U/リットルの活性濃度で含有する反応液 1 m l を調製し、ガラス試験管において、反応温度 30℃、100r.p.m. の振とうを行い反応を実施した。反応液のpHは微量の硫酸により8.2に調整した。反応開始後、直ちに反応液の色調は濃くなり、8時間後には顕著な高分子化の進行が認められ、20時間後には反応液の大部分が固化した。

【0087】また、ポリフェノールオキシダーゼをサゲノメラ・s p. (*Sagenomella sp.*) SD3102 (受託番号 FERM P-15964) またはスタキリジウム・s p. (*Stachy* 10 *lidium sp.*) SD3103 (受託番号 FERM P-15965) から得た凍結乾燥品に変えて上記実施例と同様に反応を行った場合も同様の速度で高分子化と固化が進行した。また、リグニンスルホン酸の代わりにリグニン (アルカリ) (nacalai tesqueから入手) を30% (W/V) の濃度で用い、300 U/リットルのポリフェノールオキシダーゼの活性濃度、pH8.5 で反応を実施したところ、高分子化反応の進行の結果、反応開始の24時間後には反応液全体が粘性の高い液状を呈した。

【0088】なお、分子量分析用サンプルは、反応液の一部を抜き取り、水浴中で約100℃、15分間の加熱処理を行い、反応を停止し、これをHPLCによって分析した。HPLCでの分析は、溶離液として50mMのリン酸カリウムバッファー (pH7.0) もしくは0.1 mMの硫酸ナトリウム水溶液、検出器としてShodex RI (昭和電工 (株) 製示差屈折率検出器) を用い、さらにはカラムとして、Shodex PROTEIN KW-802.5 (2連)、もしくはShodex PROTEIN KW802.5 (昭和電工 (株) 製) とShodex OHpak SB-804HQ (昭和電工 (株) 製) を連結したものをを用いるGFCによって行った。

【0089】なお、リグニンスルホン酸ナトリウム塩を30% (W/V)、ポリフェノール酸化酵素として市販のポリフェノールオキシダーゼ (*Rigidoporus zonalis* 由来、TaKaRa (株) から入手) を300 U/リットルの活性濃度で含有する反応液 1 m l を調製し、ガラス試験管において、反応温度30℃、100r.p.m. の振とうを行い反応を実施した。ここで用いた市販のポリフェノールオキシダーゼは、シリングルダジンをを用いる活性測定で、pH 6~7 に至適反応 pH を有する酸性酵素であることが示されたため、高分子化反応での反応液の pH は少量の硫酸を用いて6.5に調整した。反応開始後、直ちに反応液の色調は濃くなったが、反応液の大部分が固化するためには、約80時間の反応時間を要した。また、この酵素を反応液の pH が8.5 の状態で同様の高分子化反応に用いた場合は、反応開始後80時間においても固化は認められな 40 かった。

【0090】実施例 11 : 土壌改質

リグニンスルホン酸ナトリウム塩を30% (W/V)、ポリフェノールオキシダーゼとして実施例 8 記載のスティルベラ・s p. (*Stilbella sp.*) SD3101 (受託番号FE 50

RM P-15963) から得た凍結乾燥物を100 U/リットルの活性濃度で添加し、反応温度30℃、pH8.5 で高分子化反応を行い、水溶性の高分子化リグニンスルホン酸を得、これを水で2倍に希釈したものを調製した。希釈前の溶液の粘度は、R型粘度計 (VISCONIC EHD R (ROTHER N o. 7)、東京計器 C o., L T D 社製) による測定で、ずり速度 1 のとき16Pa・s、ずり速度 2 のとき14.5Pa・s、ずり速度 20 のとき11.25Pa・s であった。なお、熱などによる高分子化反応の停止操作は行わなかった。

【0091】この高分子化リグニンスルホン酸水溶液 3.0m l もしくは水 3.0m l を、40 g 重量の畑土壌を含む50m l 容のガラスビーカーにおいて、土壌表面に噴霧し、28℃でインキュベートし、乾燥による重量の減少を測定した。60時間後に、高分子化リグニンスルホン酸溶液を噴霧したものは約 8 g、水を噴霧したものは約 11 g の重量の減少を示し、高分子化リグニンスルホン酸による保水性の向上が認められた。また、高分子化リグニンスルホン酸溶液を噴霧したものでは土壌表面の硬度の向上が認められ、団粒構造の保持、土壌改質、種子吹付表土安定化などを目的とする用途に有用であることが示された。また、ポリフェノールオキシダーゼをサゲノメラ・s p. (*Sagenomella sp.*) SD3102 (受託番号 FERM P-15964) またはスタキリジウム・s p. (*Stachy* 30 *lidium sp.*) SD3103 (受託番号 FERM P-15965) から得た凍結乾燥品に変えて上記実施例と同様に反応を行った場合も、同等の保水性向上、土壌表面の硬度の向上を認めた。

【0092】実施例 12 : 木材処理

1%のp-フェニレンジアミン・二塩酸 (関東化学 (株) から入手) 水溶液を少量のNaOHを用いてpH8.5 に調製したものに、ポリフェノールオキシダーゼとして実施例 8 記載のスティルベラ・s p. (*Stilbella sp.*) SD3101 (受託番号 FERM P-15963) から得た凍結乾燥物を20U/リットルの活性濃度で添加し、直ちに、この溶液にスギ木片 (3cm×3cm×1cm、木口面が3cm×3cm) を沈めた状態で、650~700mmHgでの減圧を30分間実施し、さらに浸漬したまま常圧に15分間放置した。その後、木片を取り出して表面の溶液を拭き取り、24℃で2日間放置して、乾燥と酵素反応を進行させた。さらに、この木片に水200m l を加え、水面下に木片を沈めた状態で、25℃、8時間、マグネチックスターラーを用いて回転子を回転させた後、木片を取り出して表面の水を拭き取り、24℃で4日間放置して乾燥させた。こうして得られた木片では、着色反応が木片表面及び内部で速やかに進行し、黒褐色の着色物が沈着した結果、木片内部においても強固に着色されていた。

【0093】実施例 13 : 木材処理

実施例 8 記載のポリフェノールオキシダーゼ (凍結乾燥物) を300U/リットル、及びリグニンスルホン酸ナ

トリウム塩を 5% (W/V)、0.04M 硫酸銅、さらに 0.08M エチレンジアミンを含む木材処理用の反応液を調製し、スギ木片 (3 cm × 3 cm × 2 cm、木口面が 3 cm × 3 cm) に対して減圧含浸処理を行った。なお、pH の調整には、水酸化ナトリウムもしくは硫酸を使用した。また、減圧含浸操作は、処理液中にスギ木片を浸漬した後に 650 ~ 700 mmHg での減圧を 1 時間実施し、さらに浸漬したまま常圧に 30 分間置くという簡便法によって行った。この減圧含浸操作により、充分量の処理液 (10 ~ 14 g 量) が注入されていることを、含浸操作の前後の木片重量の測定により確認した。

【0094】さらに、含浸処理を終えた木片を 28℃ の恒温室に 5 日間置き、乾燥と高分子化反応を行った後に、それぞれの木片に水 200 ml を加え、水面下に木片を沈めた状態で、マグネチックスターラーを用いて回転子を回転させ、25 ± 3℃ で 8 時間の攪拌を行うこと

で、溶脱操作を行った。そして、溶脱操作後の水 (溶脱液) について、280 nm での吸光度を測定することでリグニンスルホン酸の溶脱量を、また、1-(2-ピリジルアゾ)-2-ナフトール (1-(2-Pyridylazo)-2-naphthol、アルドリッチ・ケミカル・カンパニから入手、PAN と略記する) を用いる錯形成と吸光分析を行うことで薬剤の溶脱量を算出した。その結果、ポリフェノール酸化酵素とリグニンスルホン酸を用いる木材圧力処理により、効果的な薬剤注入と固定が可能であること、pH 8 以上のアルカリ側において特にその効果が大きいことが示された。対照として、ポリフェノール酸化酵素が存在しない場合などの結果も併せて、詳細な結果を表 2 に示した。

【0095】

【表 2】

使用酵素の 調製源	使用薬剤とその濃度		処理 液の pH	溶脱率(%)	
				LSA*	銅
SD3101株	0.04M CuSO ₄ + 0.08M EDA**		7.0	40.1	45.6
	0.04M CuSO ₄ + 0.08M EDA**		7.5	15.4	16.6
	0.04M CuSO ₄ + 0.08M EDA**		8.2	0.7	3.2
	[対照]	5 % LSA* のみ	8.5	0.6	—
		0.04M CuSO ₄ のみ	4.1	ND	ND
SD3102株	0.04M CuSO ₄ + 0.08M EDA**		7.0	45.1	48.3
	0.04M CuSO ₄ + 0.08M EDA**		7.5	15.5	16.8
	0.04M CuSO ₄ + 0.08M EDA**		8.2	0.8	3.8
	[対照]	5 % LSA* のみ	8.5	0.8	—
		0.04M CuSO ₄ のみ	4.1	ND	ND
SD3103株	0.04M CuSO ₄ + 0.08M EDA**		7.0	46.3	48.8
	0.04M CuSO ₄ + 0.08M EDA**		7.5	16.9	18.4
	0.04M CuSO ₄ + 0.08M EDA**		8.2	0.8	3.7
	[対照]	5 % LSA* のみ	8.5	0.8	—
		0.04M CuSO ₄ のみ	4.1	ND	ND
[対照] 酵素なし	0.04M CuSO ₄ + 0.08M EDA**		7.0	51.3	52.1
	0.04M CuSO ₄ + 0.08M EDA**		7.5	38.3	41.5
	0.04M CuSO ₄ + 0.08M EDA**		8.2	13.2	29.8
	[対照]	5 % LSA* のみ	8.5	58.2	—
		0.04M CuSO ₄ のみ	4.1	—	60.5

* LSA ; リグニンスルホン酸

** EDA ; エチレンジアミン

【0096】実施例14：木材処理

実施例8記載のスティルベラ・s p. (*Stilbella sp.*) SD3101 (受託番号FERM P-15963) 由来ポリフェノールオキシダーゼ (凍結乾燥物) を300U/リットル、及びリグニンスルホン酸ナトリウム塩を5% (W/V)、さらに様々な薬剤を含む木材処理用の反応液を調製し、実施例13と同様にスギ木片の減圧含浸処理と乾燥・高分子化反応、溶脱処理を行った。なお、水溶性の低い薬剤においては、リグニンスルホン酸水溶液を60～90℃に加温してから薬剤を添加し、さらにボルテックス・ミキサーにより薬剤を懸濁、分散あるいは溶解させ

た後、25℃に冷却し、ここにポリフェノールオキシダーゼ凍結乾燥物を添加することで処理液を調製した。

【0097】そして、溶脱操作後の水 (溶脱液) について、280nmでの吸光度を測定することでリグニンスルホン酸の溶脱量を、また、PANもしくはキナリザリン (和光純薬工業 (株) から入手) を用いる錯形成と吸光分析や、HPLCあるいはガスクロマトグラフィーを用いる分離・同定・定量、もしくは原子吸光分析を行うことで薬剤の溶脱量を算出した。使用した薬剤が280nmでの吸収を有する場合は、前記の方法で濃度を測定した薬剤の280nmにおける吸光度を算出し、溶脱液

の280nmでの吸光度から薬剤による影響分を除算することで、リグニンスルホン酸の濃度を算出した。そして、含浸処理時に注入されたリグニンスルホン酸及び薬剤の量を100%として、溶脱量を比較した。その結果、ポリフェノール酸化酵素とリグニンスルホン酸を用いる木材圧力処理により、効果的な薬剤注入と固定が可能であること、pH8以上のアルカリ側において特にその効果が大きいことが示された。対照として、ポリフェノール酸化酵素が存在しない場合の結果も併せて、詳細*

*な結果を表3に示した。なお、(+)-カテキン・H₂O、タンニン酸、アリルイソチオシアネートはアルドリッチ・ケミカル・カンパニから、炭酸銅(炭酸銅(II)一水和物)、硫酸銅、硫酸亜鉛、塩化ニッケル、ホウ酸、硫酸銀は和光純薬工業(株)から、ヒノキチオール、1,3,5-トリクロロベンゼンは東京化成工業(株)からそれぞれ入手した。

【0098】

【表3】

使用薬剤とその濃度	酵素の有無	処理液のpH	溶脱率(%)	
			リグニンスルホン酸	薬剤
—	有	8.5	0.4	—
0.1M CuSO ₄ +0.1M EDTA	有	8.5	5.9	10.4(銅)
0.1M CuSO ₄ +0.1M EDTA	無	8.5	26.5	30.1(銅)
0.1M CuSO ₄ +0.1M EDTA	有	7.5	12.2	19.7(銅)
0.1M CuSO ₄ +0.1M EDTA	有	7.0	20.3	28.8(銅)
0.1M CuSO ₄ +0.1M トリロ 三酢酸	有	8.2	4.3	5.5(銅)
0.1M CuSO ₄ +0.1M トリロ 三酢酸	無	8.2	24.1	30.3(銅)
0.04M 炭酸銅+0.08M EDA*	有	8.2	0.6	2.6(銅)
0.04M 炭酸銅+0.08M EDA*	無	8.2	12.0	25.6(銅)
0.04M ZnSO ₄ +0.08M EDA*	有	8.2	0.9	3.1(亜鉛)
0.04M ZnSO ₄ +0.08M EDA*	無	8.2	15.3	14.9(亜鉛)
0.04M NiCl ₂ +0.08M EDA*	有	8.2	1.1	3.8(ニッケル)
0.04M NiCl ₂ +0.08M EDA*	無	8.2	16.6	17.2(ニッケル)
1% 酢酸	有	8.6	0.7	25.1(杓素)
1% 酢酸	無	8.6	22.1	32.3(杓素)
1000ppm ヒノキチオール	有	8.5	0.6	3.1
1000ppm ヒノキチオール	無	8.5	24.2	14.4
1000ppm ヒノキチオール +0.01M CuSO ₄	有	8.1	0.7	3.3(H**)
1000ppm ヒノキチオール +0.01M Ag ₂ SO ₄	有	8.5	0.8	3.0(H**)
1000 ppm (+)-カテキン・H ₂ O	有	8.8	2.7	2.8
1000 ppm (+)-カテキン・H ₂ O	無	8.8	23.4	11.3
500 ppm タニン酸	有	8.7	3.8	4.0
100 ppm アリルイソチオシアネート	有	8.5	3.5	2.2
200 ppm o-フェニレンジアミン	有	8.5	1.0	0.2
200 ppm 1,3,5-トリクロロベンゼン+T***	有	8.5	2.3	0.2

* EDA ; エチレンジアミン

** H ; ヒノキチオール

*** T ; Tween80 を500ppmの濃度で使用

【0099】実施例15 : 木材処理

ポリフェノール酸化酵素系として、実施例8記載のサゲ

ノメラ・s p. (*Sagenomella* sp.) SD3102 (受

託番号FERM P-15964) 由来ポリフェノールオキシダーゼ

(凍結乾燥物)を300U/リットル、市販パルオキシダーゼを5000U/リットル、及びアルコールオキシダーゼを5000U/リットル、さらにメタノールを1%の濃度で使用し、実施例13と同様にスギ木片の減圧含浸処理と乾燥・高分子化反応、溶脱処理を行い、含浸処理時に注入されたリグニンスルホン酸及び薬剤の量を100%として、溶脱量を比較した。その結果、同様に効果的な薬剤注入と固定が可能であることが示された。*

*詳細な結果を表4に示した。なお、パルオキシダーゼは西洋ワサビ由来品(Typell, Sigmaから入手)、アルコールオキシダーゼはカンディダ・ボイディニ(Candida boidini)由来品(Boehringer Mannheim Biochemicaから入手)を使用した。

【0100】

【表4】

使用薬剤とその濃度	酵素の有無	処理液のpH	溶脱率(%)	
			リグニンスルホン酸	薬剤
0.1M CuSO ₄ +0.1M EDTA	有	8.5	6.3	13.5 (銅)
0.04M CuSO ₄ +0.08M EDA*	有	8.1	0.6	2.1 (銅)
0.1M CuSO ₄ +0.1M ニトロ 三酢酸	有	8.2	2.8	5.2 (銅)
0.04M 炭酸銅+0.08M EDA*	有	8.2	0.5	2.0 (銅)
0.04M 硫酸亜鉛+0.08M EDA*	有	8.2	0.6	2.9 (亜鉛)
1% 杉酸	有	8.6	0.5	23.8 (杉素)
1000ppm ヒノキチオール	有	8.5	0.4	2.3 (H**)
1000 ppm (+)-カテキン・H ₂ O	有	8.8	1.5	2.5
500 ppm タニン酸	有	8.7	1.9	3.3

* EDA ; エチレンジアミン

** H ; ヒノキチオール

【0101】実施例16：木材処理

実施例8記載のスティルバラ・s p. (*Stilbella sp.*) SD3101 (受託番号FERM P-15963) 由来ポリフェノールオキシダーゼ(凍結乾燥物)を300U/リットル、リグニンスルホン酸ナトリウム塩を5%(W/V)、さらに桐油を2000ppm含む木材処理用の反応液を調製し、実施例13と同様にスギ木片の減圧含浸

処理と乾燥・高分子化反応、溶脱処理を行い、含浸処理時に注入されたリグニンスルホン酸及び薬剤の量を100%として、溶脱量を比較した。その結果、薬剤固定性のさらなる向上が認められた。詳細な結果を表5に示した。

【0102】

【表5】

使用薬剤とその濃度	酵素の有無	処理液のpH	溶脱率 (%)	
			リグニンスルホン酸	薬剤
0.04M CuSO ₄ + 0.08M EDA*	有	8.1	0.5	2.3 (銅)
0.04M ZnSO ₄ + 0.08M EDA*	有	8.2	0.6	2.0 (亜鉛)
0.04M NiCl ₂ + 0.08M EDA*	有	8.2	0.6	2.1 (ニッケル)
1000ppm ヒノキオール	有	8.5	0.4	2.2
1000ppm ヒノキオール + 0.01M CuSO ₄	有	8.1	0.5	2.3 (H**)
100 ppm アリルイソチオシアネート	有	8.5	2.0	1.2
200 ppm 1,3,5-トリクロロベンゼン + T***	有	8.5	1.4	0.2

* EDA ; エチレンジアミン

** H ; ヒノキチオール

*** T ; Tween80 を500ppmの濃度で使用

【0103】実施例17：木材処理

ワサビの根茎部10gをミキサーにより破碎後、水を10ml加え、これを布巾でろ過することでワサビ抽出液を得た。そして、実施例8記載のスティルベラ・sp.

(*Stilbella sp.*) SD3101 (受託番号FERM P-15963) 由来ポリフェノールオキシダーゼ (凍結乾燥物) を300U/リットル、リグニンスルホン酸ナトリウム塩を5% (W/V)、さらに前記のワサビ抽出液を5%含む木材処理用の反応液を調製し、実施例13と同様にスギ木片の減圧含浸処理と乾燥・高分子化反応、溶脱処理を行い、含浸処理時に注入されたリグニンスルホン酸の量を100%として、溶脱量を算出したところ、木材内部での重合反応の進行の結果、リグニンスルホン酸の溶脱量は5.8%に留まっており、ワサビ抽出物を含む木材処理物が得られることが示された。

【0104】実施例18：木材処理

実施例8記載のスティルベラ・sp. (*Stilbella sp.*) SD3101 (受託番号FERM P-15963) 由来ポリフェノールオキシダーゼ (凍結乾燥物) を300U/リットル、リグニンスルホン酸ナトリウム塩を5% (W/V)

V)、さらに様々な薬剤を含む木材処理用の反応液を調製し、実施例3及び4と同様にスギ木片 (3cm×3cm×2cm、木口面が3cm×3cm) に対する減圧 (前排气) 及び加圧含浸処理を行った。減圧及び加圧は、圧力反応器 (3リットル容) 内にスギ木片をセットし、さらに木片の上に木片を沈めるための重りを載せた後、まず、真空ポンプを用いて600～720mmHg、30分間の前排气を行い、次に反応器内部の陰圧を利用して処理液を流入することで処理液中への木材の浸漬を行い、さらにポンプ (T-50K TEST-PUMP, キョーワ (株) 社製) を用いて処理液を流入させ、10気圧、1時間の加圧を行った。含浸処理後の木片は、さらに実施例13と同様に乾燥・高分子化反応と溶脱処理を行い、含浸処理時に注入されたリグニンスルホン酸及び薬剤の量を100%として、溶脱量を比較した。その結果、同様に効果的な薬剤注入と固定が可能であることが示された。詳細な結果を表6に示した。

【0105】

【表6】

使用薬剤とその濃度	酵素の有無	処理液のpH	溶脱率 (%)	
			リグニンスルホン酸	薬剤
—	無	8.5	26.3	—
—	有	8.5	0.3	—
0.04M CuSO ₄ + 0.08M EDA*	有	8.1	0.6	3.1 (銅)
0.04M ZnSO ₄ + 0.08M EDA*	有	8.2	0.8	2.7 (亜鉛)
0.04M NiCl ₂ + 0.08M EDA*	有	8.2	0.8	3.0 (ニッケル)
1000ppm ヒノキチオール	有	8.5	0.4	2.5
1000ppm ヒノキチオール + 0.01M CuSO ₄	有	8.1	0.5	2.6 (H**)
1000 ppm (+)-カテキン・H ₂ O	有	8.8	2.0	2.0
500 ppm タニン酸	有	8.7	2.5	3.2

* EDA ; エチレンジアミン

** H ; ヒノキチオール

【0106】実施例19：木材処理

実施例8記載のスティルベラ・s p. (*Stilbella sp.*) SD3101 (受託番号FERM P-15963) 由来ポリフェノールオキシダーゼ (凍結乾燥物) を300U/リットル、リグニンスルホン酸ナトリウム塩を2% (W/V) 含む木材処理用の反応液を調製し、実施例18と同様にスギ木片の減圧及び加圧含浸処理と乾燥・高分子化反応を行った。なお、反応液のpHは8.5に調整した。次に、0.4% (W/V) ポリエチレンジアミン (アルドリッチ・ケミカル・カンパニーから入手、平均分子量700) と0.02M硫酸銅を含む水溶液を調製し、前記の木片に対して実施例18と同様の減圧及び加圧含浸処理を行うことで2段階目の含浸操作を行った。こうして得られた処理木材を6日間風乾した後、実施例13と同様の溶脱処理を行い、含浸処理時に注入された銅イオンの量を100%として、溶脱量を算出したところ、銅イオンの溶脱量は1.5%に留まっていた。木材内部でのリグニンスルホン酸の重合・固定と、リグニンスルホン酸、銅イオン、及びポリエチレンジアミンの複合物の形成により、銅イオンが木材内に強固に固定されることが示された。

【0107】また、第1段階として、5% (W/V) ポリエチレンジアミンと0.25M硫酸銅を含む水溶液を、実施例13と同様にしてスギ木片に注入した後、6日間風乾し、さらに、実施例8記載のスティルベラ・s p. (*Stilbella sp.*) SD3101 (受託番号FERM P-15963) 由来ポリフェノールオキシダーゼ (凍結乾燥物) を300U/リットル、リグニンスルホン酸ナトリウム塩を10% (W/V) 含む反応液をこの木片に塗布し、28

℃、相対湿度80%の恒温恒湿インキュベーターに3日間置き、酵素重合反応を進行させた。その結果得られた木片は、銅錯体の木材表面への移行が防止されており、しかも、より自然な褐色の表面色を付与されていた。

【0108】実施例20：木材処理

実施例8記載のスティルベラ・s p. (*Stilbella sp.*) SD3101 (受託番号FERM P-15963) 由来ポリフェノールオキシダーゼ (凍結乾燥物) を300U/リットル、リグニンスルホン酸ナトリウム塩を5% (W/V)、さらに0.5%のp-フェニレンジアミン・二塩酸 (関東化学 (株) から入手) 含む木材処理用の反応液を調製し、一部に芯材を含むスギ木片 (3cm×3cm×10cm、木口面が3cm×3cm) に対して実施例18と同様の減圧及び加圧含浸処理を行い、さらに、実施例13と同様の乾燥・高分子化反応、溶脱処理を行ったところ、木材の辺材部分がより強く含浸、発色、固定された結果、木材の芯材部分と辺材部分の色調、色度の差は小さくなり、より均一な外観を有する、茶褐色の着色を有する木材を得ることができた。

【0109】実施例21：木材処理物の抗菌性試験

500ml容のガラス・ビーカーを培養器に用い、4%グルコース、1.5%麦芽抽出物、0.3%ペプトン、2%寒天を含む100mlの寒天培地 (pH6.5) に、腐朽菌であるオオウズラタケ (*Tyromyces palustris*) FEPR1 0507 もしくはカワラタケ (*Coriolus versicolor*) FEPR1 1030 (共に、農林水産省森林総合研究所より入手) を接種し、26℃、1週間の培養を行った。このようにして得られた培養菌の上に、実施例18におい

て得られた溶脱処理後の木片を、カワラタケでは直接に、オオウズラタケでは殺菌した約1mmの厚さの耐熱性プラスチックの網を置きその上に、繊維方向を垂直にして載せ、26℃で12週間置くことで抗菌操作を行った。なお、抗菌操作の前に、実施例9において得られた溶脱処理後の木片を60℃の乾燥器中に48時間置き、さらに30分間デシケータ中に置くことで十分に乾燥させた後、抗菌操作前の重量を測定した。抗菌操作終了後、木片を培養器から取り出し、表面の菌糸を十分に取*

り除き、約24時間風乾した後、前記と同様に、乾燥器とデシケータを用いて十分に乾燥させてから重量を測定し、抗菌操作前の重量と比較して、重量減少率を算出した。その結果、本発明の木材処理方法により、抗菌性の付与が可能であることが示された。詳細な結果を表7に示した。

【0110】

【表7】

木材の処理条件				重量減少率(%)	
リグニン と酸の 有無	使用薬剤とその濃度	酵素の 有無	処理 液の pH	オオウズ ラタケ	カワラタ ケ
有	—	無	8.5	30.3	24.6
有	—	有	8.5	20.8	15.0
有	0.04M CuSO ₄ + 0.08M EDA*	有	8.1	3.1	0.9
有	0.04M ZnSO ₄ + 0.08M EDA*	有	8.2	4.2	2.5
有	0.04M NiCl ₂ + 0.08M EDA*	有	8.2	1.2	0.5
有	1000ppm ヒノキオール	有	8.5	4.5	3.5
有	1000ppm ヒノキオール + 0.01M CuSO ₄	有	8.1	2.5	1.6
有	1000 ppm (+)-カテキン・H ₂ O	有	8.8	8.6	7.1
有	500 ppm タンニン酸	有	8.7	10.3	8.5
無処理				36.1	27.0

・ EDA ; エチレンジアミン

【0111】実施例22：木材処理物の防蟻性試験
実施例18において得られた溶脱処理後の木片について、実施例21と同様に乾燥重量を測定し、これらを、イエシロアリの巣の周囲約40cmの土壌上に設置し、2ヶ月間放置の後、防蟻効果を観察した。そしてさらに、表面の土などを十分に取り除き、実施例21と同様

に乾燥重量を測定し、設置前の重量と比較して、重量減少率を算出した。その結果、本発明の木材処理方法により、防蟻性の付与が可能であることが示された。詳細な結果を表8に示した。

【0112】

【表8】

木材の処理条件				重量 減少率 (%)
リグニンスル ホン酸の 有無	使用薬剤とその濃度	酵素の 有無	処理 液の pH	
有	—	無	8.5	15.3
有	—	有	8.5	5.0
有	0.04M CuSO ₄ + 0.08M EDA*	有	8.1	1.0
有	0.04M ZnSO ₄ + 0.08M EDA*	有	8.2	1.2
有	0.08M NiCl ₂ + 0.08M EDA*	有	8.2	0.8
有	1000ppm ヒノキチオール	有	8.5	2.2
有	1000ppm ヒノキチオール + 0.01M CuSO ₄	有	8.1	0.8
無処理				22.9

• EDA ; エチレンジアミン

【0113】実施例23：多孔質物品処理剤

実施例8記載のスティルベラ・s p. (*Stilbella* sp.) SD3101 (受託番号FERM P-15963) 由来ポリフェノールオキシダーゼ (凍結乾燥物) を12mg、及びリグニンスルホン酸ナトリウム塩粉末10gに、さらに様々な薬剤を加え、乳鉢を用いて十分に混合した。さらに、この粉末を用いて5%水溶液を調製した場合に、pHが8.0～9.0になるように少量の炭酸ナトリウム粉末を必要に応じて添加し、十分に混和して、粉末状の多孔質物品処理剤を得た。次に、この粉末状処理剤を2週間、ガラス容器内に密栓した状態で室温に置いた後で、粉末5gをイオン交換水100mlに溶解して多孔質物品処理用の溶液を調製した。この溶液を用いて、実施例13と同様にスギ木片の減圧及び加圧含浸処理と乾燥・高分子化反応、溶脱処理を行い、含浸処理時に注入されたリグニンスルホン酸及び薬剤の量を100%として、溶脱量を比較した。その結果、粉末状処理剤により多孔

質物品の効果的な処理が可能であることが示された。詳細な結果を表9に示した。

【0114】また、上記と同様にして得た粉末状処理剤の6gをイオン交換水12mlに溶解して溶液状の多孔質物品処理剤を得た。次に、この溶液状処理剤を20ml容ネジキャップ・試験管に移し、密栓した状態で2週間、室温に置いた後で、さらにイオン交換水により10倍に希釈して多孔質物品処理用の溶液を調製した。この溶液を用いて、実施例13と同様にスギ木片の減圧及び加圧含浸処理と乾燥・高分子化反応、溶脱処理を行い、含浸処理時に注入されたリグニンスルホン酸及び薬剤の量を100%として、溶脱量を比較した。その結果、溶液状処理剤によっても多孔質物品の効果的な処理が可能であることが示された。詳細な結果を表10に示した。

【0115】

【表9】

使用薬剤	溶脱率 (%)	
	リグニンル ボン酸	薬剤
—	0.7	—
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2g+EDTA, 2.34g	6.8	13.8 (銅)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2g+EDA*, 0.96g	0.9	3.6 (銅)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2g+Glycine, 0.6g	1.0	11.1 (銅)
ZnSO_4 , 1.3g +EDA*, 0.96g	1.2	4.6 (亜鉛)
NiCl_2 , 1.0g +EDA*, 0.96g	1.6	4.3 (ニッケル)
キリ酸, 2g	0.9	24.0
ヒノキチオール, 0.2g	0.8	4.2
ヒノキチオール, 0.2g + $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5g	0.9	3.5 (H**)
(+)-カテキン- H_2O , 0.2g	3.0	3.3
タンニン酸, 0.1g	4.1	5.3
o-フェニレンジアミン, 0.04g	1.5	0.9

* EDA ; エチレンジアミン

** H ; ヒノキチオール

【0116】

【表10】

使用薬剤	溶脱率 (%)	
	リグニン 酢酸	薬剤
—	0.7	—
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2g+EDTA, 2.34g	7.2	14.2 (銅)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2g+EDA*, 0.96g	1.3	4.0 (銅)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2g+Glycine, 0.6g	0.9	12.5 (銅)
ZnSO_4 , 1.3g +EDA*, 0.96g	1.2	6.8 (亜鉛)
NiCl_2 , 1.0g +EDA*, 0.96g	1.8	5.3 (ニッケル)
酢酸, 2g	0.9	26.5 (酢 素)
ヒノキチオール, 0.2g	0.8	3.8
ヒノキチオール, 0.2g + $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5g	0.9	3.6 (H**)
(+)-カテキン- H_2O , 0.2g	3.3	3.5
タンニン酸, 0.1g	4.4	6.2
o-フェニレンジアミン, 0.04g	2.2	1.0

* EDA ; エチレンジアミン

** H ; ヒノキチオール

【0117】

【発明の効果】以上詳細に説明した通り、本発明により、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物の効率のよい高分子化反応が達成され、その高分子化合物を含む増粘剤、安定剤、凝集剤、乳化剤、分散剤、保水剤、酸化防止剤、接着剤、コンクリート混和剤、染色剤、塗料、石油回収剤、土壌改質剤、種子吹付表土安定剤、目止め剤、脱臭剤、消臭剤、農薬展着剤、殺菌剤、抗菌剤、ウィルス感染阻止剤、生物付着防止剤、生物忌避剤、殺虫剤、バグ剤、インキ基剤または木材処理剤が効率よく提供される。

【0118】また、本発明を利用することにより、フェノール化合物、アルコキシル基含有芳香族化合物、ハロゲン化フェノール化合物、キノン化合物、または芳香族アミン化合物を高分子化する工程を含む、増粘剤、安定剤、凝集剤、乳化剤、分散剤、保水剤、酸化防止剤、接着剤、コンクリート混和剤、染色剤、塗料、石油回収剤、土壌改質剤、種子吹付表土安定剤、目止め剤、脱臭剤、消臭剤、農薬展着剤、殺菌剤、抗菌剤、ウィルス感染阻止剤、生物付着防止剤、生物忌避剤、殺虫剤、バグ剤、インキ基剤または木材処理剤の効率のよい製造方法が提供される。また、本発明のポリフェノールオキシダーゼを用いることにより、有効な木材処理、コンクリート処理、土壌処理等の方法が提供される。

ート処理、土壌処理等の方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】SD3101の生産するポリフェノールオキシダーゼのpHプロファイル。

【図2】SD3102の生産するポリフェノールオキシダーゼのpHプロファイル。

【図3】SD3103の生産するポリフェノールオキシダーゼのpHプロファイル。

【図4】SD3101の生産するポリフェノールオキシダーゼの温度プロファイル。

【図5】SD3102の生産するポリフェノールオキシダーゼの温度プロファイル。

【図6】SD3103の生産するポリフェノールオキシダーゼの温度プロファイル。

【図7】SD3101の生産するポリフェノールオキシダーゼの温度安定性を示すグラフ。

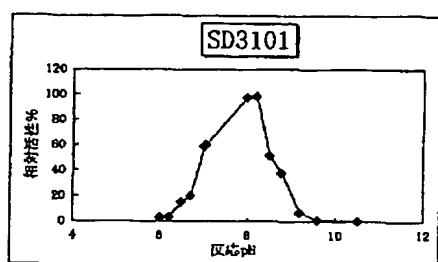
【図8】SD3102の生産するポリフェノールオキシダーゼの温度安定性を示すグラフ。

【図9】SD3103の生産するポリフェノールオキシダーゼの温度安定性を示すグラフ。

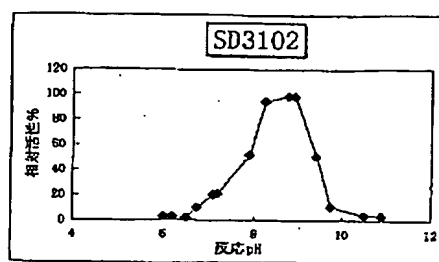
【図10】ポリフェノールオキシダーゼのpH安定性を示すグラフ。

【図11】ポリフェノールオキシダーゼ混合物のpHプロファイル。

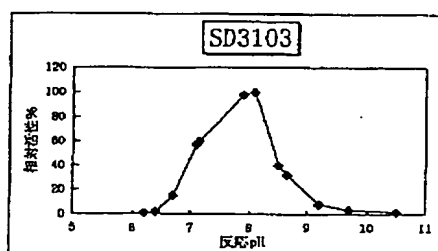
【図1】



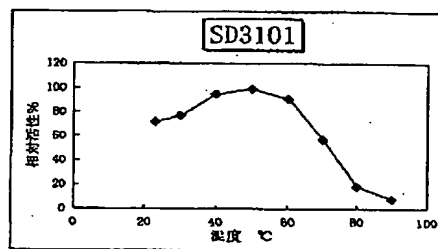
【図2】



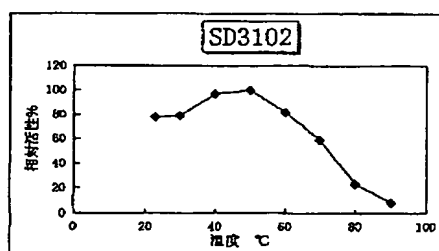
【図3】



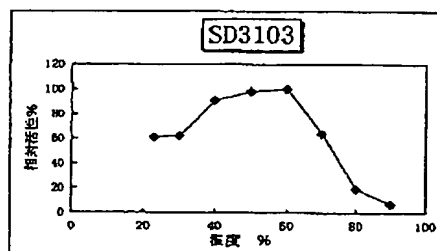
【図4】



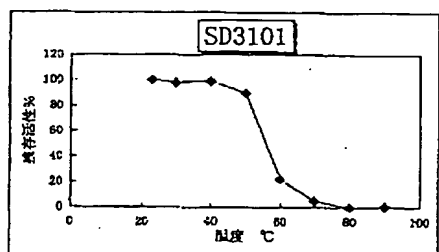
【図5】



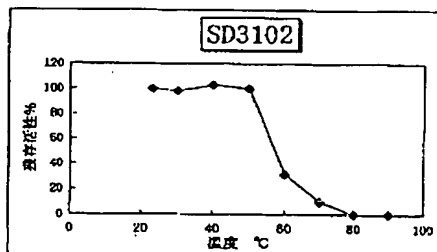
【図6】



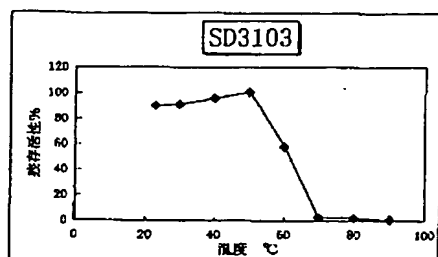
【図7】



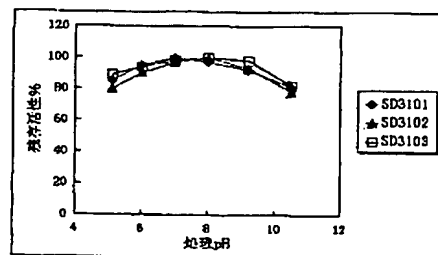
【図8】



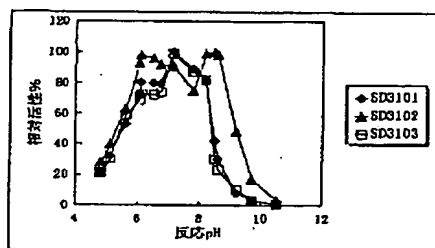
【図9】



【図10】



【図11】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

F I

C 0 8 J 7/16

C 0 8 J 7/16

9/40

9/40

C 1 2 N 9/04

C 1 2 N 9/04

E

C 1 2 P 1/00

C 1 2 P 1/00

Z

15/00

15/00

//(C 1 2 N 9/04

C 1 2 R 1:645)

(72) 発明者 大野 律子

東京都港区新橋4丁目31番7号 吉澤ビル

2階 昭光通商株式会社 S h o d e x サー

ビスセンター内